

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

DANILO NASCIMENTO FARAGO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA CLASSE DE
ACILAMINOBENZOTIAZOL CONTRA LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS**

UBERLÂNDIA – MG

2023

DANILO NASCIMENTO FARAGO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA CLASSE DE
ACILAMINOBENZOTIAZOL CONTRA LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS**

**Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia, com
requisito parcial para a obtenção de título
de licenciado em Química.**

**Orientador: Dr. Celso de Oliveira Rezende
Junior**

UBERLÂNDIA - MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFUcom
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F219 Farago, Danilo Nascimento, 1997-
2023 SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA CLASSE DE
ACILAMINOBENZOTIAZOL CONTRA LEISHMANIOSE E DOENÇA DE
CHAGAS [recurso eletrônico] / Danilo Nascimento Farago.
- 2023.

Orientador: Celso de Oliveira Rezende Júnior.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em
Química.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

1. Química. I. Rezende Júnior, Celso de Oliveira ,
1987-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.
Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Curso de Graduação em Química - Uberlândia
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1A, Sala 1A235 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4103/4178 - coliq@iqufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	QUIMICA - LICENCIATURA NOTURNO				
Defesa de:	GQL042 - Trabalho de Conclusão de Curso				
Data:	29/06/2023	Hora de início:	9:00	Hora de encerramento:	11:15
Matrícula do Discente:	11611QMI217				
Nome do Discente:	Danilo Nascimento Farago				
Título do Trabalho:	Planejamento, síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de derivados de benzotiazol contra <i>Leishmania infantum</i> .				
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				

Reuniu-se no Anfiteatro da Pós-graduação em Química, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Curso de Graduação em Química - Licenciatura Noturno, assim composta: Professores: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, orientador(a) do(a) candidato(a); Prof. Dr. Wendell Guerra (IQUFUF) e Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz (IQUFUF).

Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa, Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra, para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do curso.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(x) Aprovado(a) Nota [96] (Somente números inteiros)

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wendell Guerra, Membro de Comissão**, em 29/06/2023, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wellington de Oliveira Cruz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/06/2023, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4543702** e o código CRC **0F1A4810**.

Dedico este trabalho a minha mãe, Luciene, que infelizmente nos deixou, mas que sempre estará presente em meu coração e memória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a minha família pelo amor e apoio incondicional, em especial a minha mãe, Luciene, que infelizmente não está mais entre nós para testemunhar a realização dessa conquista. Seu suporte emocional e incentivo foram essenciais em todos os momentos dessa jornada acadêmica.

Ao professor Celso de Oliveira Rezende Junior, expresso minha profunda gratidão pela orientação e contribuição para o meu conhecimento e desenvolvimento acadêmico. Sua dedicação e paciência foram fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho e ampliação do meu conhecimento.

Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado durante essa longa jornada acadêmica, agradeço imensamente pelo apoio, incentivo e pelos momentos e experiências que compartilhamos juntos. Agradeço também aos amigos e colegas de laboratório do LaSFar, cuja a convivência proporcionou vivências enriquecedoras e trocas de experiências durante todos esses anos.

Agradeço imensamente à dra. Silvane Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte, pela realização dos ensaios biológicos contra a *Leishmania infantum* e o *Trypanosoma cruzi* e de citotoxicidade. Ao prof. Eduardo Pilau, da Universidade Estadual de Maringá, agradeço pela realização das análises de HRMS.

Expresso minha gratidão ao Raphael Tristão e ao LAFOT, pela realização das análises de infravermelho. Ao técnico Magayver e à Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), agradeço pela realização e coleta dos dados de RMN, fundamentais para a obtenção de resultados confiáveis e para a caracterização dos compostos estudados.

Por fim, agradeço também ao CNPq e todos os órgãos de fomento pela bolsa de iniciação científica, que viabilizou a minha dedicação à pesquisa e ao meu desenvolvimento acadêmico.

"A ciência é como uma vela no escuro, iluminando nosso caminho
rumo ao desconhecido." – Neil deGrasse Tyson

RESUMO

A leishmaniose e a doença de Chagas são doenças parasitárias transmitidas por insetos vetores, consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doenças tropicais negligenciadas. Elas são causadas por protozoários pertencentes a mesma ordem e família, se diferenciando pelo gênero do protozoário causador de cada doença: *Trypanossoma cruzi* da doença de Chagas e *Leishmania* da leishmaniose. Milhões de casos são reportados anualmente e existem registros de casos dessas doenças em países em que não são endêmicas. Atualmente, não existe uma cura para essas doenças, sendo a principal forma de manejo delas feito através do controle dos vetores e dos tratamentos com medicamentos. Entretanto, esses tratamentos possuem um longo tempo de duração, com graves efeitos colaterais para os pacientes, além de serem pouco eficazes. Com tudo isso, se torna nítido a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e de fácil acesso para a população. Nesse trabalho, foram sintetizados e caracterizados três compostos de uma classe de acilaminobenzotiazol, tendo como base o trabalho de Fleau e colaboradores (2019), onde uma série de compostos dessa classe foram reportados em um estudo de potenciais fármacos contra o *T. cruzi*. Após a análise do trabalho de Fleau, nosso grupo de pesquisa selecionou um desses compostos e realizou uma série de modificações em sua estrutura, sendo essas modificações feitas no fragmento benzotiazol, onde foi feita a substituição do cloro por um hidrogênio, e no fragmento ciclopropil, onde o ciclopropil foi substituído por uma metila e por uma propila. Após a síntese e caracterização dos compostos, foi feito o envio para os ensaios biológicos contra o *T. cruzi* e contra a *L. infantum*, devido a semelhança entre eles. Os resultados mostraram que todos os compostos tiveram baixa atividade contra o *T. cruzi*, sendo que a substituição do fragmento ciclopropil (composto 3 IC₅₀ 112,4 µM) pela metila diminuiu ainda mais a potência (composto 7 IC₅₀ 260,1 µM). Entretanto, contra a *L. infantum*, o composto 3 apresentou uma atividade moderada contra o parasita, com um valor de IC₅₀ de 19,9 µM, sendo o melhor composto, dentre os três sintetizados, contra esse parasita. Esse trabalho contribui para a compreensão da relação entre a estrutura-atividade de compostos da classe acilaminobenzotiazóis e no desenvolvimento de novos compostos como candidatos a fármacos contra a doença de Chagas e a leishmaniose.

Palavras-chave: Acilaminobenzotiazol. doença de chagas. Leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis and Chagas disease are parasitic diseases transmitted by vector insects, considered neglected tropical diseases by the World Health Organization (WHO). They are caused by protozoa belonging to the same order and family, differing in the genus of the protozoan causing each disease: *Trypanosoma cruzi* for Chagas disease and *Leishmania* for leishmaniasis. Millions of cases are reported annually, including in non-endemic countries. Currently, there is no cure for these diseases, and the primary management involves vector control and medication treatments. However, these treatments have a long duration, leading to severe sequelae in patients, and they also have low efficacy. Thus, there is a clear need for the development of new, more effective, and accessible drugs for the population. In this study, three compounds from the acylaminobenzothiazole class were synthesized and characterized based on the work of Fleau et al. (2019), where a series of compounds from this class were reported as potential drugs against *T. cruzi*. After analyzing Fleau's work, our research group selected one of these compounds and performed a series of structural modifications, replacing chlorine with hydrogen in the benzothiazole fragment and substituting the cyclopropyl fragment with methyl and propyl groups, while keeping the aromatic ring with hydrogen atoms only. After synthesis and characterization of the compounds, they were subjected to biological assays against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* due to their similarities. The results showed that all compounds had low activity against *Trypanosoma cruzi*, with the replacement of the cyclopropyl fragment (compound **3** IC₅₀ 112.4 μM) with methyl further decreasing potency (compound **7** IC₅₀ 260.1 μM). However, compound **3** exhibited moderate activity against *Leishmania infantum*, with an IC₅₀ value of 19.9 μM, making it the most effective compound among the three synthesized against this parasite. This study contributes to understanding the structure-activity relationship of acylaminobenzothiazole compounds and the development of new compounds as drug candidates against Chagas disease and leishmaniasis.

Key-words: Acylaminobenzothiazole. Chagas disease. Leishmaniosis.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

APT: Attached Proton Test

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CC₅₀: Concentração Citotóxica para redução de 50% da viabilidade celular

DNDi: Drugs for Neglected Disease initiative

DCM: Diclorometano

DMF: N,N-dimetilformamida

EDC: Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Et₃N: Trietilamina

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

IC₅₀: Concentração necessária para inibir 50% da concentração do alvo

IS: Índice de Seletividade

NTDs: Neglected Tropical Diseases

OMS: Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de novos casos de leishmaniose cutânea registrados em 2016.	18
Figura 2 – Foto do <i>Lutzomyia longipalpis</i> , popularmente conhecido como mosquito-palha. .	19
Figura 3 – Estruturas dos principais fármacos utilizados contra a leishmaniose.	21
Figura 4 – Mapa dos países afetados pela doença de Chagas.	23
Figura 5 – Imagem da fêmea do <i>Triatoma pseudomaculata</i>	24
Figura 6 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> no inseto vetor e no humano.	25
Figura 7 – Estruturas do Benznidazol e do Nifurtinox.	26
Figura 8 – Principais estruturas dos compostos avaliados por Fleau.	29
Figura 9 – Estrutura do composto 1 selecionado por Fleau.	30
Figura 10 – Espectro de HRMS do composto 3	35
Figura 11 – Espectro de IV do composto 3	35
Figura 12 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 3	37
Figura 13 – Espectro de RMN ¹³ C APT (101 MHz, CDCl ₃) do composto 3	37
Figura 14 – Espectro de HRMS do composto 7	41
Figura 15 – Espectro de IV do composto 7	41
Figura 16 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de 7	42
Figura 17 – Espectro de RMN ¹³ C (101 MHz, CDCl ₃) do composto 7	43
Figura 18 – Espectro de HRMS do composto 9	45
Figura 19 – Espectro de IV do composto 9	46
Figura 20 – Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 9	47
Figura 21 – Espectro de RMN ¹³ C APT (101 MHz, CDCl ₃) do composto 9	47

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Análise retrossintética do composto 3	33
Esquema 2 – Síntese do composto 3	33
Esquema 3 – Proposta de mecanismo para as reações de amidação utilizando EDC e HOBt.	34
Esquema 4 – Reação de amidação.....	40
Esquema 5 – Reação de amidação com o cloreto.....	44
Esquema 6 – Proposta de mecanismo para a reação de amidação utilizando cloreto de acila.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos valores de estiramentos observados com os valores teóricos.....	36
Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto 3 (CDCl_3).....	38
Tabela 3 – Resultados obtidos dos ensaios biológicos.	39
Tabela 4 – Relação dos valores de estiramentos observados com os valores teóricos.....	42
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto 7 (CDCl_3).....	43
Tabela 6 – Relação dos valores de estiramentos observados com os valores teóricos.....	46
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto 9 (CDCl_3).....	48
Tabela 8 – Resultados dos ensaios biológicos contra o <i>T. cruzi</i> e a <i>L. infantum</i>	49
Tabela 9 – Dados teóricos dos compostos.	51
Tabela 10 – Resultados biológicos de compostos sintetizados por colaboradores do grupo. ..	52

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Leishmaniose.....	17
1.1.1	Agente etiológico e Transmissão.....	18
1.1.2	Fármacos e tratamentos disponíveis.....	20
1.2	Doença de Chagas	22
1.2.1	Agente etiológico e Transmissão.....	23
1.2.2	Fármacos e Tratamentos disponíveis.....	25
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivos específicos.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Planejamento da síntese dos compostos.....	32
4.2	Modificação no fragmento benzotiazol.....	32
4.2.1	Síntese e caracterização do composto 3	32
4.2.2	Resultados dos ensaios biológicos do composto 3	38
4.3	Modificações no fragmento ciclopropil	40
4.3.1	Síntese e caracterização dos compostos 7 e 9	40
4.3.2	Resultados ensaios biológicos.....	49
4.4	Resultados <i>in silico</i> para os compostos sintetizados	51
4.5	Outras modificações	52
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	54
6	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	57
6.1	Reagentes e Solventes	57

6.2	Métodos Cromatográficos	57
6.3	Métodos Analíticos.....	57
6.3.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	57
6.3.2	Espectrometria de Massas	57
6.3.3	Infravermelho	58
6.4	Procedimento Experimental (Síntese).....	58
6.4.1	Síntese do composto 3	58
6.4.2	Síntese do composto 7	59
6.4.3	Síntese do composto 9	59
6.5	Procedimento dos ensaios biológicos contra o <i>T. cruzi</i>	60
6.5.1	Ensaio <i>in vitro</i> da β -galactosidase	60
6.6	Procedimento dos ensaios biológicos contra a <i>L. infantum</i>	61
6.6.1	Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i>	61
6.6.2	Avaliação da citotoxicidade	62
7	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um subconjunto de 20 doenças infecciosas diversas, que compartilham duas características importantes entre si. A primeira é a prevalência dessas doenças nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, estando associadas a áreas de pobreza e poucos recursos de saúde, presentes em comunidades rurais remotas, favelas urbanas e populações deslocadas próximos a essa região. A segunda característica é que, até recentemente, essas doenças eram negligenciadas, em algum grau, por órgãos de financiamento, pesquisadores ou formuladores de políticas (BRINDHA et al., 2021; FEASEY, 2010).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses e a doença de Chagas são doenças parasitárias transmitidas por insetos vetores, incluídas dentro do subconjunto citado. As duas possuem diversas semelhanças entre si, pois ambas são causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família *Trypanosomatidae* (se caracterizando pela presença de um flagelo e um cinetoplasto). Elas se diferenciam pelo gênero dos parasitas causadores, sendo o agente causador da doença de chagas o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e o da leishmaniose a *Leishmania*, sendo essa última composta por cerca de 30 espécies diferentes e dividida em dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*), com base no desenvolvimento do parasita no intestino do vetor (AVELAR, 2008; BOECHAT, 2015; MEDEIROS, 2013).

1.1 Leishmaniose

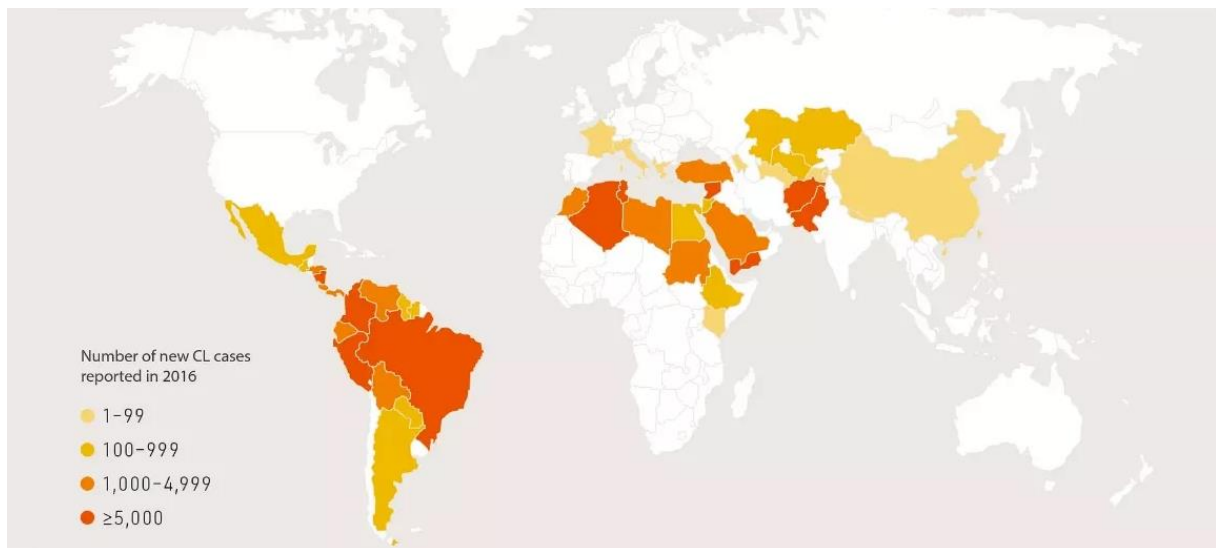
A leishmaniose humana é uma doença tropical negligenciada, causada por protozoários parasitas e transmitida por vetores, sendo uma das maiores doenças parasitárias endêmicas no mundo e responsável por um alto número de mortes. Ela afeta principalmente a população mais pobre e está relacionada a condições precárias de vida, como indivíduos com imunidade comprometida e desnutrição (MCNAMARA, 2022).

A leishmaniose pode se manifestar através de duas formas principais: a leishmaniose cutânea, que é a forma mais comum da doença; e a leishmaniose visceral, também chamada de calazar, que é a forma mais letal da doença. Ranqueada em segundo lugar no índice de mortalidade entre as DTNs, a leishmaniose visceral é causada por algumas espécies do protozoário parasita *Leishmania*, especialmente as espécies *Leishmania donovani* (*L. donovani*) e *Leishmania infantum* (*L. infantum*). Atacando os órgãos internos,

principalmente o fígado, o baço e a medula óssea, a leishmaniose visceral é caracterizada por febre irregular, anemia, perda de peso e inchaço do fígado e do baço, embora as infecções possam ser assintomáticas (MCNAMARA, 2022; LAL, 2023).

Dados recentes mostram que entre 600 milhões a 1 bilhão de pessoas em todo o mundo estão em risco de desenvolver a infecção, sendo a leishmaniose cutânea a responsável por milhares de novos casos todos os anos, com mais de 85% dos casos ocorrendo em apenas 10 países, incluindo Brasil, Argélia e Paquistão (Figura 1) (DNDi, 2021).

Figura 1 – Número de novos casos de leishmaniose cutânea registrados em 2016.



Fonte: DNDi, 2021. Disponível em: <https://dndial.org/doencas/leishmaniose-cutanea#dados/>.

Enquanto isso, a forma visceral da doença é endêmica na Ásia, África e América Latina, com cerca de 50.000 a 90.000 novos casos a cada ano. Em 2020, mais de 90% dos novos casos reportados à OMS ocorreram em apenas 10 países, incluindo a Índia, Brasil, Sudão e Quênia. A doença está frequentemente associada a condições precárias de vida, como pobreza, falta de saneamento e acesso limitado à saúde, o que torna o controle ainda mais desafiador (DNDi, 2021).

1.1.1 Agente etiológico e Transmissão

As *Leishmanias* são transmitidas aos seres humanos por meio da picada de cerca de 30 diferentes espécies de flebotomíneos, dípteros da família *Psychodidae*. O *Lutzomyia longipalpis* (mosquito-palha) é o principal vetor de transmissão da *L. infantum* no Brasil (Figura 2) (BOECHAT, 2015; SOUSA, 2019).

Figura 2 – Foto do *Lutzomyia longipalpis*, popularmente conhecido como mosquito-palha.



Fonte: InfoEscola (2023). Disponível em: <https://www.infoescola.com/insetos/mosquito-palha>.

O ciclo de transmissão do parasita no vetor se inicia quando a fêmea, ao se alimentar do sangue de um indivíduo infectado, ingere macrófagos parasitados pela forma amastigota (forma não flagelada) da *Leishmania*. Ao atingir o intestino do inseto, os macrófagos se rompem, ocorrendo a liberação das formas amastigotas, que se reproduzirão por divisão binária e se transformarão na forma promastigota (forma flagelada). As formas promastigotas também se reproduzirão por divisão binária, permanecendo na faringe e no esôfago do vetor até se transformarem nas formas promastigotas metacíclicas (forma infectante), completando o ciclo do parasita no vetor, o que leva cerca de 72 horas (BOECHAT, 2015).

Ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, as fêmeas dos insetos regurgitam as formas promastigotas metacíclicas. Na derme do hospedeiro vertebrado, os macrófagos fagocitam as formas promastigotas, que se transformarão na forma amastigota e realizarão uma intensa replicação, através da divisão binária, até romperem os macrófagos. As amastigotas liberadas no espaço intercelular serão fagocitadas por novos macrófagos, num processo contínuo, de forma que a disseminação por meio do sangue ocorra (BOECHAT, 2015; MEDEIROS, 2013).

A transmissão da leishmaniose pode ocorrer por outras vias além da transmissão vetorial por insetos, incluindo a transfusão de sangue, transmissão venérea (durante o ato sexual) e congênita (transmitida da mãe para o feto pela placenta durante a gestação) (BOECHAT, 2015).

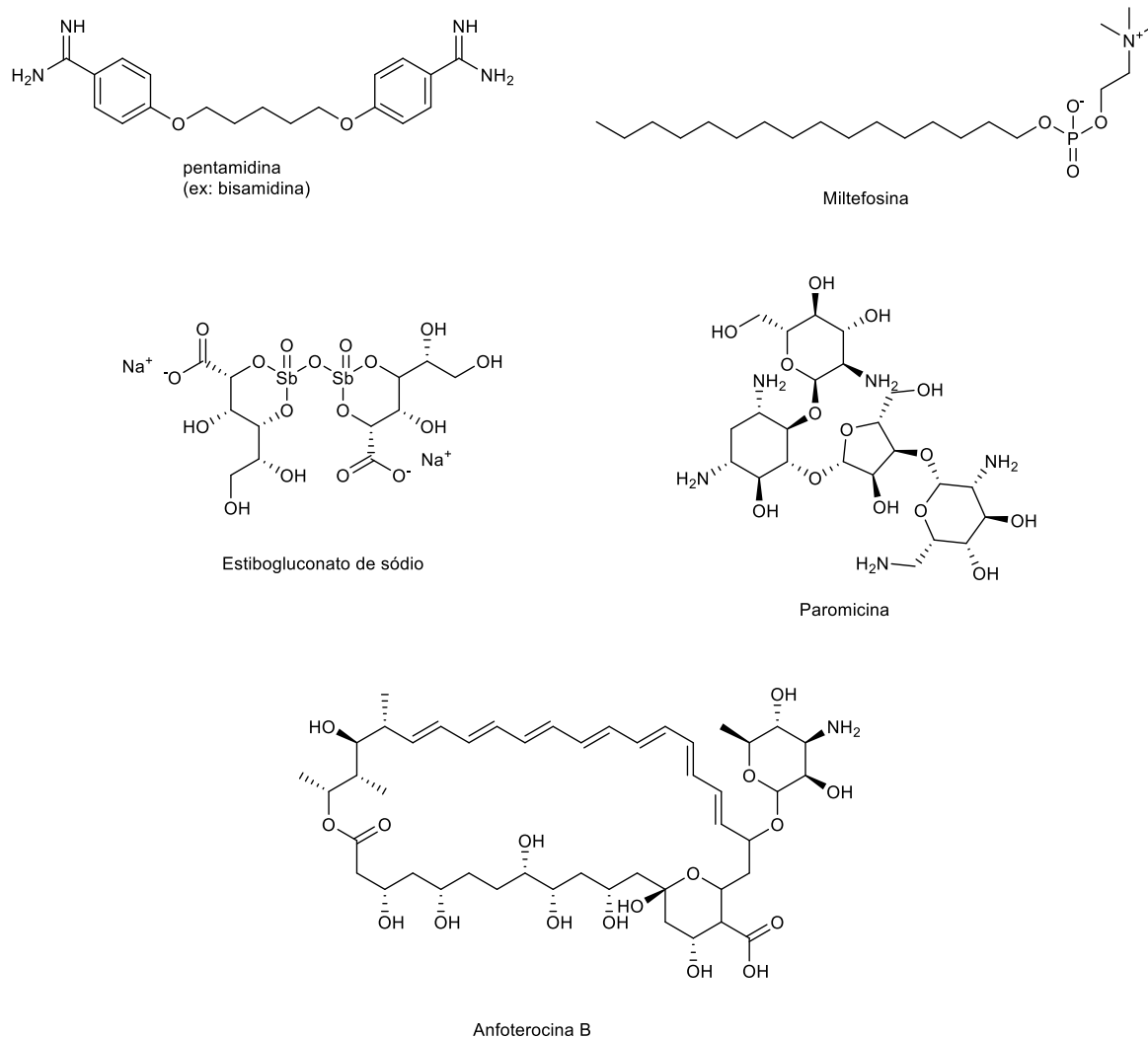
Os hospedeiros que permitem que o parasita sobreviva e seja disseminado são chamados de reservatórios. Os principais reservatórios da *Leishmania* são mamíferos silvestres, como roedores de floresta e canídeos silvestres. No entanto, com o processo de urbanização do ciclo zoonótico, outros animais também desempenham um papel importante como reservatórios da *Leishmania*. Os cães tornaram-se os principais hospedeiros reservatórios da leishmaniose devido à sua proximidade com os humanos (DANTAS-TORRES, 2007).

1.1.2 Fármacos e tratamentos disponíveis

Atualmente, não existe nenhuma vacina eficaz contra a Leishmaniose, sendo o principal método de manejo da doença feito através do controle dos vetores da doença e o tratamento por quimioterapia. A erradicação da doença se torna complicada devido à presença de um grande número de hospedeiros reservatórios, tanto em animais domésticos quanto em animais selvagens, que podem carregar as diversas espécies de *Leishmania* nos países endêmicos (MCNAMARA, 2022).

Os medicamentos atualmente utilizados no tratamento da leishmaniose incluem: a bisamidina, os antimonídeos, a paromomicina, a anfotericina B lipossomal e a miltefosina (Figura 3) (LAL, 2023).

Figura 3 – Estruturas dos principais fármacos utilizados contra a leishmaniose.



Fonte: Autor

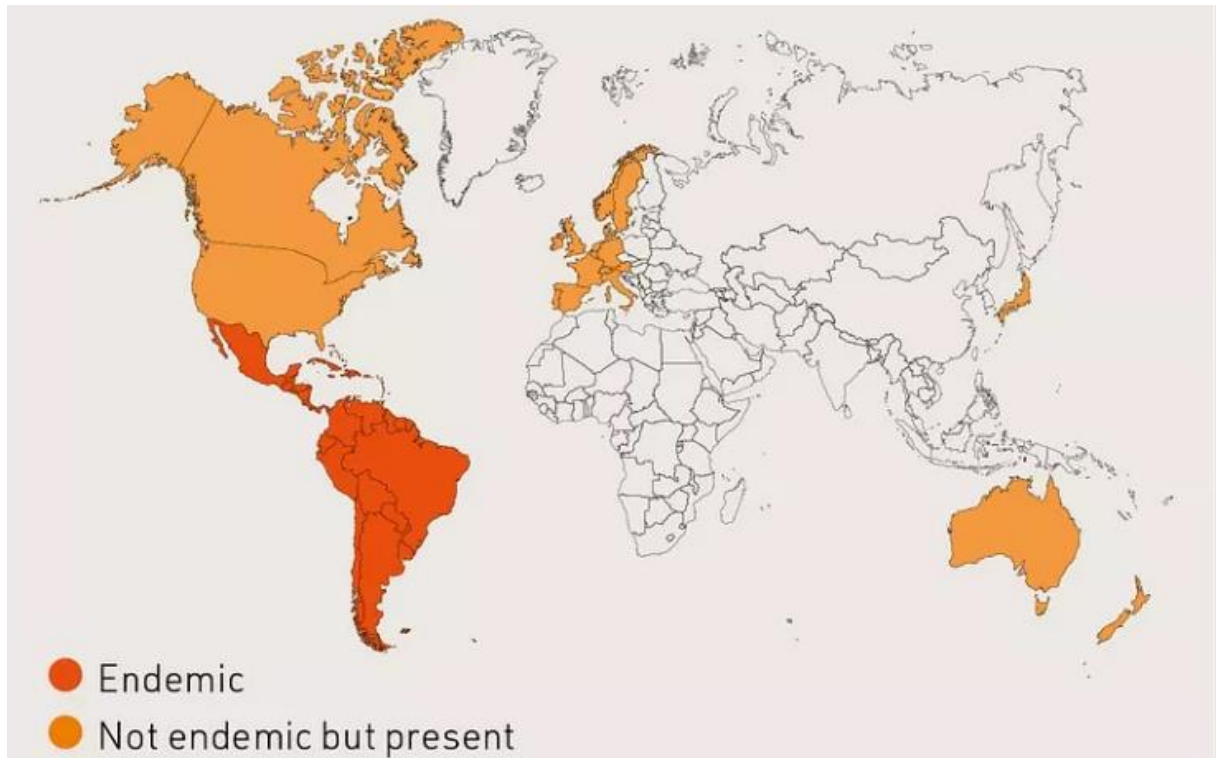
Nas últimas décadas, foram feitas diversas colaborações entre a indústria e a academia, a fim de se desenvolver novos compostos mais eficazes contra as doenças negligenciadas. Diversas classes de compostos foram reportadas na busca pelo desenvolvimento de um novo fármaco eficaz contra a leishmaniose, sendo algumas dessas classes, compostos derivados de nitro-heterociclos, isoxazóis, benzopiranonas, compostos de amino-pirazol ureia, pirazolopiridinas e 1,4-diarilpiperazina (MCNAMARA, 2022; LAL, 2023). Entretanto, a maioria desses compostos, apresentaram algumas limitações que impediram o desenvolvimento desses compostos em fármacos, como uma atividade modesta-fracas contra as espécies de leishmania *in vitro* e *in vivo*, além de possuírem toxicidade que impediu o aprimoramento desses compostos (LAL, 2023).

1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase Americana, é uma doença tropical negligenciada resultante da infecção pelo protozoário parasita *T. cruzi*, sendo a principal causa de cardiomiopatia na América Latina e no mundo (FLEAU, 2019; BRACK, 2010). Ela é transmitida para os humanos através da picada do inseto da família *Reduviidae*, popularmente conhecido como "barbeiro", que serve como vetor de transmissão da doença. A transmissão ocorre quando o inseto vetor da doença se alimenta do sangue e defeca próximo à ferida de sua vítima. Outras formas de transmissão são através da transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita e ingestão de alimentos contaminados (FLEAU, 2019).

Segundo o DNDi (2020), é estimado que mais de 6 milhões de pessoas ao redor do mundo possuem a doença de Chagas e cerca de 70 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença, principalmente nos países da América Latina, onde a mesma é endêmica em 21 países. A cada ano, por volta de 30 mil novos casos da doença são registrados, e, em 2019, foram reportadas cerca de 10 mil mortes causadas pela infecção. No entanto, é necessário ressaltar que menos de 10% dos infectados pela doença foram diagnosticados, o que evidencia a necessidade na melhoria no diagnóstico e tratamento da doença. Além disso, a Doença de Chagas não está restrita aos países da América Latina, estando presente também na América do Norte, Europa, Japão e Austrália (Figura 4).

Figura 4 – Mapa dos países afetados pela doença de Chagas.



Fonte: DNDi (2020). Disponível em: <https://dndial.org/doencas/doenca-de-chagas#fatos-sobre-a-doena>.

A doença de Chagas possui duas fases sucessivas de contágio, a fase aguda e a fase crônica. Na fase aguda, ocorre a presença de uma alta concentração de parasitas no corpo, porém, nessa fase, o indivíduo não apresenta sintomas ou apresenta alguns poucos sintomas como febre, anorexia e taquicardia, o que torna seu diagnóstico difícil. Em 90% dos casos, esses sintomas desaparecem espontaneamente e a maioria dos indivíduos não irá apresentar sintomas relacionados à doença, o que dificulta a determinação e o diagnóstico da doença para os indivíduos nessa fase. Somente cerca de 30-40% dos indivíduos infectados irão evoluir para a fase crônica da doença, desenvolvendo problemas neurológicos, cardíacos, digestivos ou cardiodigestivos clínicos. A complicação mais severa da doença é a Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC), cujo único tratamento, em muitos casos, é o transplante de coração (LIDANI, 2019).

1.2.1 Agente etiológico e Transmissão

De acordo com o Guia dos Triatomíneos do Estado de São Paulo, publicado pela Secretaria de Estado da Saúde, os vetores de transmissão desse parasita são os insetos hematófagos triatomíneos, pertencentes à ordem Hemiptera e à família *Reduviidae*, conhecidos popularmente como "barbeiros". No Brasil, são descritas mais de 62 espécies de triatomíneos, sendo que 30 deles podem ser encontrados em ambientes domiciliares, porém

somente 5 apresentam participação direta na transmissão da doença: *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida* e *Panstrongylus megistus* (Figura 5).

Figura 5 – Imagem da fêmea do *Triatoma pseudomaculata*.



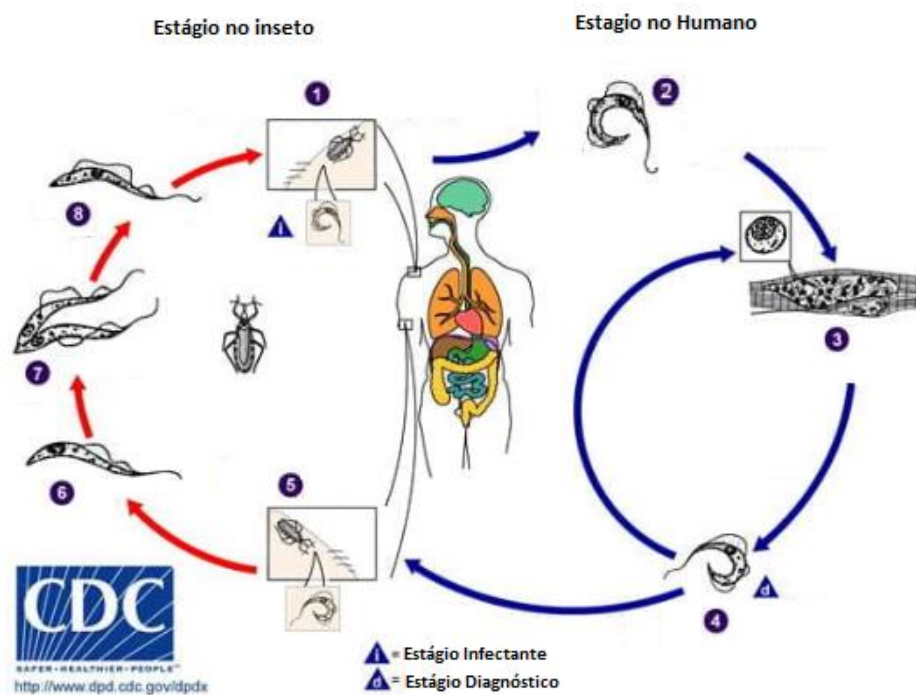
Fonte: Coleção de *Triatominae*, UNESP (2020). Disponível em: <https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/triatoma/triatoma-pseudomaculata/>.

A presença do barbeiro em ambiente humano pode ser determinada pela maneira como a população humana interage com o ambiente, através da sua ocupação e exploração do ambiente. Dessa forma, algumas questões importantes devem ser analisadas, afim de compreender os fatores que determinam a prevalência desses vetores próximo ao ambiente humano, fatores como a degradação do ambiente e as condições socioeconômicas que aquela população se encontra, se moram em habitações que se encontram em situação precária ou próximas de matas. Com isso, é possível perceber que a colaboração da população na procura e identificação do barbeiro é de extrema importância no combate ao vetor (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ, s.d.).

O *T. cruzi* é transmitido para os humanos quando o inseto vetor infectado se alimenta do sangue do indivíduo e defeca as formas tripomastigotas metacíclicas (forma móvel e infectante, mas não replicável) do parasita perto da ferida (1). As tripomastigotas entram no hospedeiro através da ferida e infectam as células próximas, onde se transformam

nas formas amastigotas (2). Dentro da célula, as amastigotas se multiplicam através de fissão binária, causando a condição clínica da doença de Chagas (3). Uma vez que a célula infectada está saturada com as amastigotas (cerca de 4-5 dias após a infecção), estas se transformam em tripomastigotas, rompendo a célula hospedeira e entrando na corrente sanguínea (4). Ao entrar na corrente sanguínea, as tripomastigotas podem infectar as células de outros tecidos, se transformar na forma amastigota e multiplicar a infecção sintomática em novo local e repetir o processo de infecção (Figura 6) (FLEAU, 2019; MARTINHO, 2021; MANUAL MSD, 2023).

Figura 6 – Ciclo de vida do *T. cruzi* no inseto vetor e no humano.



Fonte: Imagem adaptada do Manual MSD (2023).

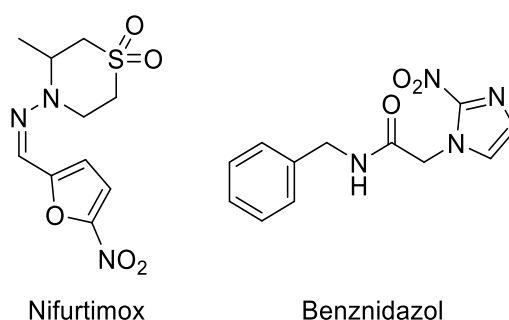
É nesse momento que ocorre a infecção de um novo inseto vetor, que se alimenta do sangue infectado do indivíduo e incorpora os tripomastigotas circulantes (5). No intestino médio do inseto os tripomastigotas são convertidos em epimastigota (forma não infecciosa) e se multiplicam (6 e 7), transformando-se novamente em tripomastigotas infecciosos no intestino grosso e excretados nas fezes (8), infectando novos hospedeiros e iniciando um novo ciclo de transmissão (FLEAU, 2019; MARTINHO, 2021; MANUAL MSD, 2023).

1.2.2 Fármacos e Tratamentos disponíveis

Os medicamentos disponíveis atualmente contra a doença de Chagas, consiste no Nifurtimox, desenvolvido em 1967 pela Bayer, e o Benznidazol, desenvolvido em 1972 pela

Roche (Figura 7) (MARTINHO, 2021). No Brasil, o tratamento é iniciado com a indicação do médico, logo após a confirmação da doença na fase aguda, sendo o Benznidazol fornecido gratuitamente pelo Ministério da Saúde, tendo duração de 60 dias (SECRETARIA DE ESTADO DE SAUDE DE GOIAS, 2019). O Nifurtimox não é comercializado na América Latina (MARTINHO, 2021), porém, segundo uma nota técnica da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, em casos de intolerância ou em que o paciente não responde ao tratamento com Benznidazol, o Nifurtimox pode ser utilizado.

Figura 7 – Estruturas do Benznidazol e do Nifurtimox.



Fonte: Autor

É importante ressaltar que esses dois medicamentos possuem eficácia somente na fase aguda, não apresentando uma eficácia adequada contra a doença na fase crônica (FLEAU, 2019). Entretanto, como mencionado anteriormente, a fase aguda é geralmente assintomática e, portanto, dificilmente o paciente é diagnosticado nessa fase. Além disso, o tempo de duração do tratamento é longo, podendo levar de 60-90 dias, e possuem diversos efeitos colaterais sérios, tais como anorexia, náusea, vômito e vertigem, o que faz com que os pacientes frequentemente abandonem o tratamento (MARTINHO, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

Com tudo isso, se torna evidente a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos eficazes contra as doenças tropicais negligenciadas, em especial contra as leishmanioses e a doença de Chagas.

Como dito por Lal (2023) e McNamara (2022), a alta toxicidade, o longo tempo de duração do tratamento e problemas relacionados à acessibilidade e ao alto custo dos medicamentos são alguns dos principais fatores que dificultam o tratamento, o controle e eventual erradicação das leishmanioses. Além disso, muitas espécies de *Leishmania* têm desenvolvido resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da doença. Outro ponto importante a ser considerado é a necessidade da administração dos medicamentos por via parenteral (na qual o medicamento é administrado diretamente na corrente sanguínea do paciente) em locais que possuem poucos recursos, o que gera um problema maior de acessibilidade ao tratamento.

Enquanto isso, o tratamento da doença de Chagas consiste em medicamentos com baixa eficácia na fase crônica, apresentando eficácia consistente somente durante a fase aguda, que é caracterizada por possuir poucos ou nenhum sintoma. Dessa forma, o indivíduo que está com a doença nessa fase não irá apresentar nenhum sintoma evidente relacionado a doença e, conseqüentemente, não será diagnosticado, somente sendo diagnosticado caso evolua para a fase crônica da doença, onde os medicamentos possuem pouca ou nenhuma eficácia (FLEAU, 2019; BRACK, 2010). O tratamento da doença de Chagas apresenta um longo tempo de duração e uma alta toxicidade, o que pode gerar sérios efeitos colaterais no paciente, o que faz com que muitos pacientes acabem abandonando o tratamento antes do tempo (FLEAU, 2019).

Outros fatores que evidenciam a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos eficazes contra essas doenças são o alto número de mortes causadas pela leishmaniose em todo o mundo, estando em segundo lugar no índice de mortalidade entre as doenças tropicais negligenciadas (MCNAMARA, 2022). Além disso, a doença de Chagas está se espalhando para outros continentes fora da América, com casos relatados em países da Europa, Japão e Austrália. Isso é uma consequência da globalização, em que as pessoas carregam o parasita sem saber, e do aquecimento global, que aumenta o número de insetos vetores em áreas residenciais (FLEAU, 2019).

Com tudo isso em vista, tem havido uma intensa colaboração entre a iniciativa privada e a academia em busca de identificar novos compostos que possam atuar como novos fármacos contra as doenças tropicais negligenciadas (MCNAMARA, 2022).

Nessa busca pelo desenvolvimento de novos fármacos, diversos compostos já foram relatados. Em seu artigo de 2022, Lal, trouxe alguns exemplos de classes de compostos testados (dentre eles os nitro-heterociclos, os isoxazóis, as benzopiranonas e os derivados de 1,4-diarilpiperazina), na tentativa de descobrir potenciais fármacos contra a leishmaniose, porém os compostos possuíam atividade relativamente baixa *in vitro* e *in vivo*, além de apresentarem uma alta toxicidade que impediu o avanço desses compostos. Nos anos 2010's, uma nova classe de compostos inibidores da enzima CYP51 (tais como o Posaconazol e o profarmaco E1224), chegou a fase de testagem clínica contra a doença de Chagas, porém, eles foram abandonados por demonstrarem serem ineficazes em seres humanos, com a taxa de falha do tratamento chegando a 70% dos casos, um número muito alto, ainda mais quando comparado aos 30% dos pacientes que foram tratados com Benznidazol (FLEAU, 2019).

Nesse sentido, é possível perceber a necessidade do desenvolvimento de novos compostos, com maior atividade biológica e eficácia contra essas doenças negligenciadas, sendo importante que esses compostos sejam baratos e com biodisponibilidade oral, para que, dessa forma, seja possível para as regiões com poucos recursos financeiros possam obter e administrar esses medicamentos, aumentando assim a acessibilidade ao tratamento dessas doenças (LAL, 2023).

Nesse trabalho, foram planejados e sintetizados uma série de compostos derivados de acilaminobenzotiazol, com o objetivo de avaliar seu potencial e eficácia contra a doença de Chagas e a leishmaniose. Esse projeto teve como base o trabalho de Fleau, publicado em 2019, que relatou o potencial de atividade contra a doença de Chagas de uma série de compostos derivados de acilaminobenzotiazol.

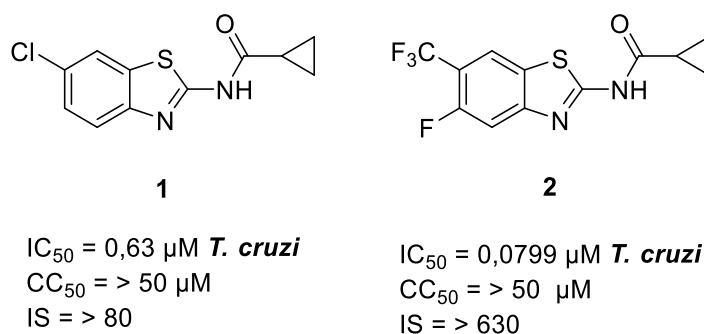
No trabalho de Fleau e colaboradores, eles descobriram um composto com potente atividade *in vitro* contra a doença de Chagas, sendo chamado de *hit*, a partir de uma triagem automatizada em grande escala de uma série de compostos reportados em 2009 pelo Instituto de Broad. O composto foi selecionado a partir de alguns critérios estabelecidos por eles, como valor de IC₅₀ menor que 1,2 µM, índice de seletividade (IS = CC₅₀/IC₅₀) maior que 100, seguir a Regra de 5 de Lipinski, serem compostos inéditos que ainda não foram descritos na literatura, além de serem passível de otimização e melhorias.

Essa regra estabelece alguns critérios que as moléculas devem possuir, que são: não possuir mais de 5 átomos doadores de ligação de hidrogênio; não possuir mais de 10

aceptores de ligação de hidrogênio; possuir massa molecular menor que 500 daltons (Da); possuir um coeficiente de partição (log P) menor que 5. Segundo essa regra, para que um composto possa funcionar como fármaco oralmente ativo, não pode violar mais do que dois desses critérios (ARNOTT, 2012).

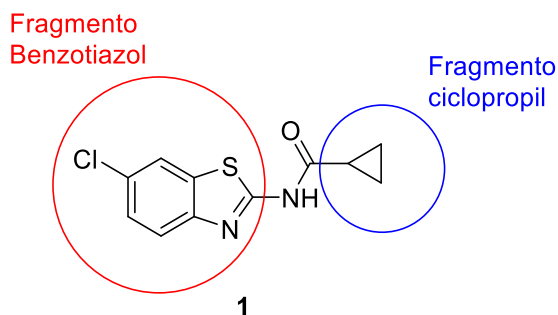
O composto **1** foi escolhido por Fleau, que sintetizou e iniciou um processo de otimização desse composto, realizando diversas modificações em alguns fragmentos da estrutura química dessa molécula. Através dessas modificações estruturais, eles encontraram o composto **2**, com um perfil de atividade biológica melhor do que o da molécula *hit* selecionado por eles, possuindo uma maior potência *in vitro* e uma atividade *in vivo* interessante contra o *T. cruzi* (Figura 8). Essa nova molécula é chamada *lead* e esse processo, de identificação de uma molécula com atividade *in vitro* e sua modificação estrutural para encontrar uma nova molécula com atividade *in vivo*, é chamado de *hit-to-lead*.

Figura 8 – Principais estruturas dos compostos avaliados por Fleau.



Fonte: Autor

Ao analisarmos esse trabalho, observamos uma extensa exploração dessa classe de compostos, com diversas modificações estruturais realizadas para identificar os grupos mais eficazes em cada fragmento molecular. Entretanto, identificamos algumas lacunas em relação a certas modificações que não foram realizadas, representando pontos de interesse a serem explorados. O principal ponto, foi a ausência de análise de compostos contendo somente hidrogênios no fragmento benzotiazol, além da possibilidade de explorar outras modificações no fragmento ciclopropil (Figura 9). Isso nos motivou a planejar, sintetizar e avaliar a atividade biológica de derivados de acilaminobenzotiazol, com modificações no fragmento benzotiazol e no fragmento ciclopropil, contra a doença de Chagas.

Figura 9 – Estrutura do composto **1** selecionado por Fleau.

Fonte: Autor

Além disso, como mencionado anteriormente, a doença de Chagas e a leishmaniose, apresentam algumas semelhanças entre si, como a presença de flagelos e cinetoplastos, uma vez que ambas são doenças negligenciadas causadas por protozoários pertencentes a mesma ordem e família. Essas semelhanças poderiam indicar que esses compostos possam ser ativos contra os dois protozoários causadores das duas doenças. Dessa forma, nosso grupo de pesquisa decidiu testar também a atividade biológica desses compostos contra a *L. infantum*, principal causador da leishmaniose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade biológica de uma série de compostos de acilaminobenzotiazol contra os protozoários *T. cruzi* e *L. infantum*.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar uma série de compostos de acilaminobenzotiazol.
- Determinar a atividade biológica dos compostos sintetizados contra a *T. cruzi* e a *L. infantum*.
- Determinar a citotoxicidade dos compostos sintetizados.
- Avaliar a relação entre estrutura e atividade biológica dos compostos sintetizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento da síntese dos compostos

Após analisar o trabalho de Fleau e colaboradores (2019), percebemos que alguns fragmentos da molécula escolhida por eles não foram completamente explorados, na análise da relação estrutura-atividade dos compostos. Os principais pontos em que notamos que os fragmentos não foram completamente explorados, foram nos fragmentos do benzotiazol e do ciclopropil.

Embora diversos compostos tenham sido explorados por eles, as alterações realizadas no fragmento benzotiazol consistiram principalmente em analisar a influência da posição do cloro no anel aromático, da substituição do cloro por outros grupos substituintes diferentes (tanto retiradores quanto doadores de elétrons), bem como, da presença de dois substituintes diferentes ao invés de somente um. Entretanto, nenhum dos compostos analisados por eles possuíam somente hidrogênios em seu anel aromático, de forma que o efeito do fragmento do benzotiazol sem substituintes diferentes no seu anel não era conhecido.

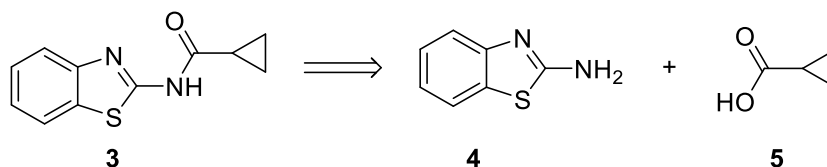
Com isso em mente, nosso grupo decidiu iniciar esse projeto analisando o efeito do fragmento benzotiazol somente com hidrogênios como substituinte, mantendo o fragmento ciclopropil intacto, afim de verificar a influência da presença de grupos substituintes no anel para a atividade biológica dos compostos. Com esse composto sintetizado e os resultados biológicos em mãos poderíamos analisar e planejar as próximas modificações que poderiam ser realizadas na estrutura da molécula.

4.2 Modificação no fragmento benzotiazol

4.2.1 Síntese e caracterização do composto 3

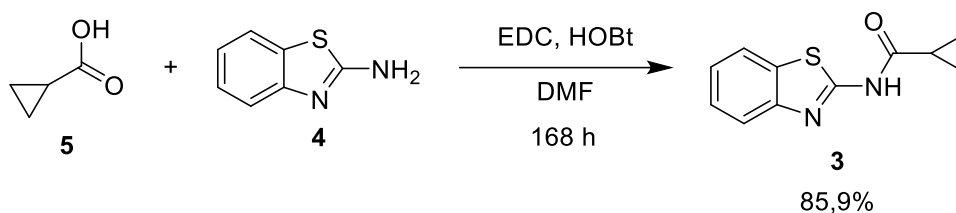
Após a análise retrossintética do composto (esquema 1), constatamos que o mesmo poderia ser obtido através de uma única reação, utilizando reagentes disponíveis comercialmente.

Esquema 1 – Análise retrossintética do composto 3.



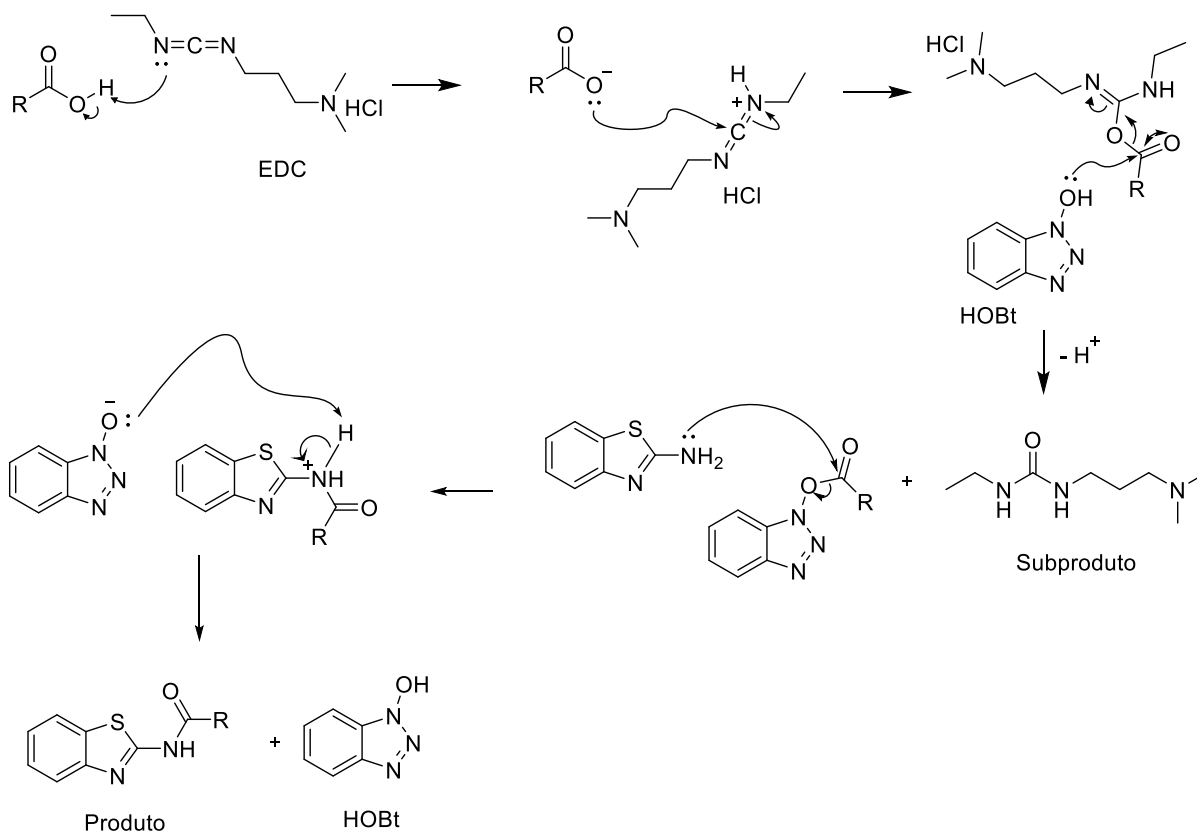
Dessa forma, o composto **3** foi obtido em 85,9% de rendimento através da reação de amidação entre o benzotiazol **4** e o ácido carboxílico **5**, na presença de EDC e HOBt, utilizando DMF como solvente, a temperatura ambiente (Esquema 2).

Esquema 2 – Síntese do composto 3.



A proposta do mecanismo de reação, utilizando EDC como ativador e HOBt como catalisador, pode ser observada abaixo no Esquema 3. A reação inicia com a desprotonação do ácido carboxílico pelo EDC, em seguida, o carboxilato irá atacar o carbono eletrofílico do EDC, formando um intermediário. A hidroxila do catalisador, HOBt, irá fazer um ataque nucleofílico ao carbono eletrofílico do intermediário, liberando ureia como subproduto e formando um éster ativado, que irá sofrer então um ataque da amina (benzotiazol), facilitado devido a presença de um bom grupo de saída. Por fim, irá ocorrer a transferência de prótons, onde o catalisador irá ser restaurado e a amida será formada.

Esquema 3 – Proposta de mecanismo para as reações de amidação utilizando EDC e HOBT.

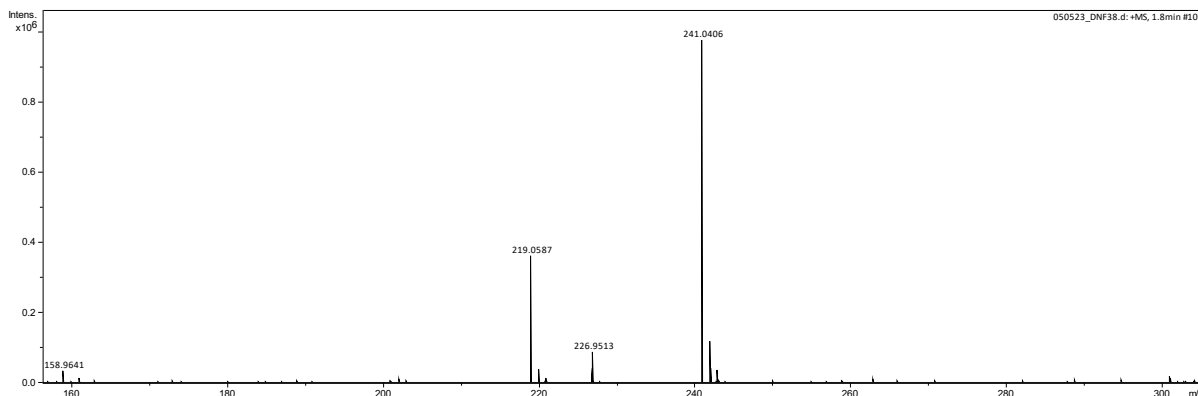


Após a obtenção do composto, foi realizada a sua caracterização, utilizando três técnicas analíticas fundamentais: a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS), Infravermelho (IV) e a Ressonância Nuclear Magnética (RMN). A Espectrometria de Massas de Alta Resolução foi utilizada para determinar com precisão a massa molecular do composto, fornecendo, assim, informações valiosas sobre a composição elementar e estrutura do produto obtido. Em seguida, utilizando a técnica de Infravermelho, foi possível realizar a identificação dos grupos funcionais presentes no composto através da análise das vibrações moleculares características de cada ligação. Por fim, a Ressonância Magnética Nuclear forneceu informações estruturais importantes sobre a molécula, de forma que, através delas, foi possível estudar e analisar a estrutura molecular do composto. Cada uma dessas técnicas desempenhou um papel importante na caracterização detalhada do composto, fornecendo informações cruciais para os estudos subsequentes.

O produto obtido foi analisado através de HRMS (Figura 10), onde foi possível observar o principal pico do íon molecular em m/z 241,0406, sendo o valor teórico para o composto $[M+Na]^+$ desejado em m/z 241,0406, tendo um erro de 0 ppm. Além disso é possível observar um outro pico em m/z 219,0587, referente ao íon molecular do composto $[M+H]^+$, cujo o valor teórico é em m/z 219,0587. Como o valor teórico do composto

$[M+Na]^+$ é o mesmo do valor experimental $[M+Na]^+$, é possível concluir que o produto obtido possui a mesma massa e fórmula molecular do composto desejado, o que indica a obtenção do composto esperado.

Figura 10 – Espectro de HRMS do composto 3.



Com os dados do infravermelho (figura 11), foi possível observar as bandas referentes ao estiramento da ligação dupla entre carbonos (1596 cm^{-1}), da ligação dupla entre carbono e oxigênio (1688 cm^{-1}), da ligação entre hidrogênio e carbono, (uma banda centrada em 2918 cm^{-1}) e da ligação entre o nitrogênio e o hidrogênio da amida (3136 cm^{-1}). Os estiramentos das ligações observadas correspondiam aos estiramentos teóricos (como pode ser observado na Tabela 1), reforçando assim a estrutura proposta para o produto esperado.

Figura 11 – Espectro de IV do composto 3.

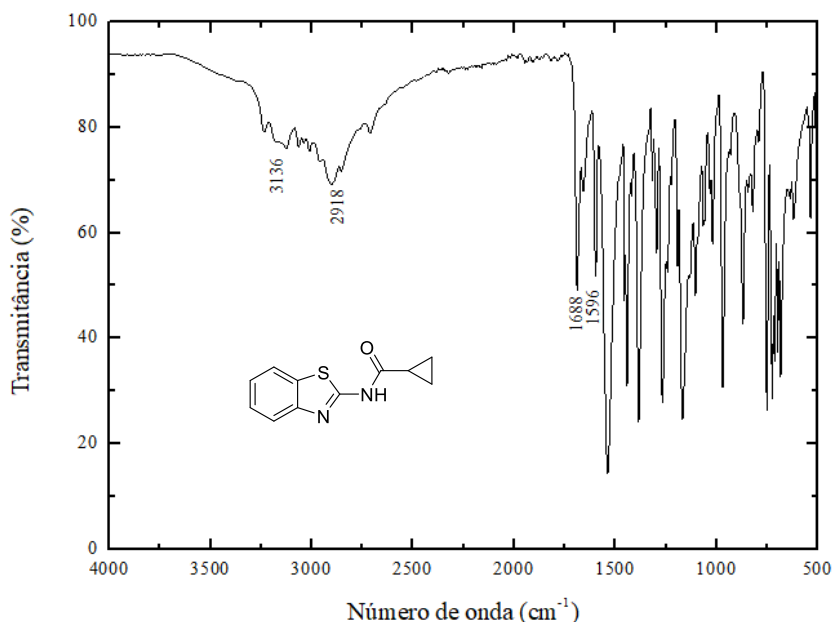


Tabela 1 – Relação dos valores de estiramentos observados com os valores teóricos.

Ligação	Experimental (cm⁻¹)	Teórico^a (cm⁻¹)
C=C	1596	1600
C=O	1688	1700-1640
C-H	2918	3150-2850
N-H	3136	3500-3100

a: Os valores teóricos dos estiramentos das ligações foram retirados do livro de Pavia, 2015.

Por fim, foi feita a análise dos espectros de RMN ¹H (Figura 12) e RMN ¹³C APT (Figura 13). No espectro de ¹H, foi possível observar os quatro hidrogênios referentes aos hidrogênios do anel aromático, o singleto de um hidrogênio, referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida, além dos cinco hidrogênios referentes aos hidrogênios do fragmento ciclopropil. Enquanto isso, no RMN de carbono APT, é possível identificar os seis carbonos do anel aromático (sendo dois deles não ligados a hidrogênios e quatro carbonos ligados a um hidrogênio cada), dois carbonos sem nenhum hidrogênio ligado, sendo um referente ao carbono da carbonila e outro referente ao carbono ligado aos dois nitrogênios, além dos carbonos referentes ao anel do fragmento ciclopropil (com um sinal indicando um carbono ligado a um hidrogênio e outro sinal indicando dois carbonos ligados a dois hidrogênios). As atribuições aos hidrogênios e carbonos estão reportadas na Tabela 2.

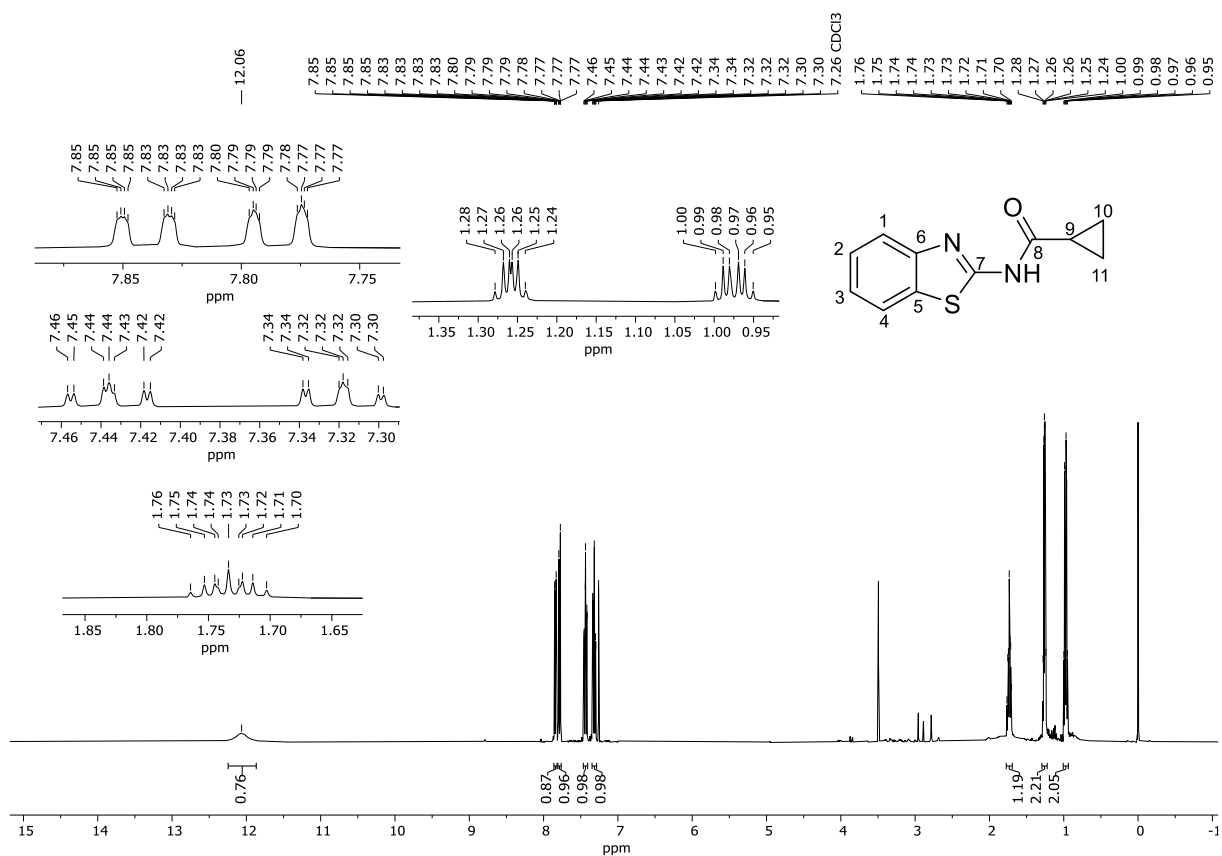
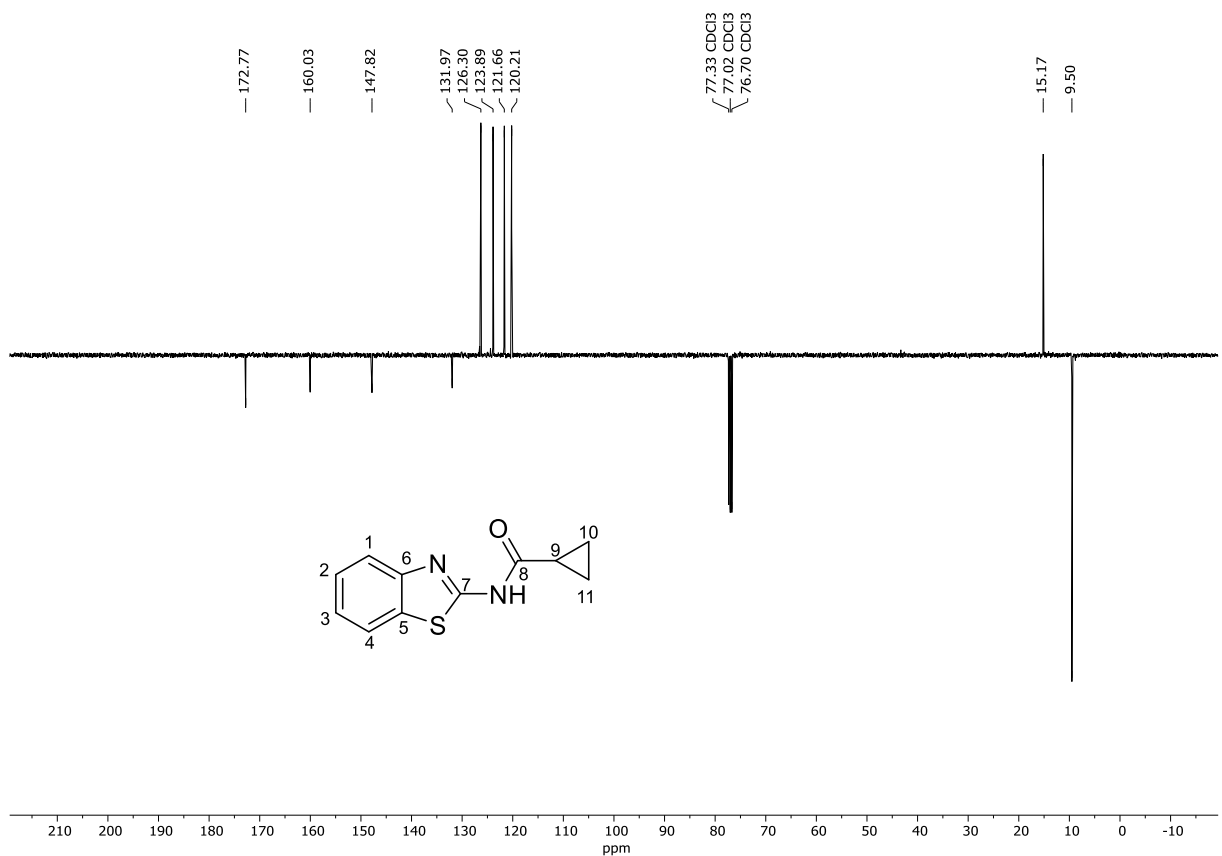
Figura 12 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 3.Figura 13 – Espectro de RMN ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) do composto 3.

Tabela 2 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **3** (CDCl_3).

Posição H	Nº de H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} J^{c})	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (m^{b})	Posição C
NH	1	12,06 (s)	-	-
-	-	-	172.77 (C)	C8
-	-	-	160.03 (C)	C7
-	-	-	147.82 (C)	C6
-	-	-	131.97 (C)	C5
H2	1	7.44 (td, 8.3, 7.2, 1.3)	126.30 (CH)	C2
H3	1	7.35 – 7.29 (m)	123.89 (CH)	C3
H4	1	7.78 (ddd, 8.1, 1.1, 0.6)	121.66 (CH)	C1 e C4
H1	1	7.84 (ddd, 7.9, 1.2, 0.6)	120.21 (CH)	C1
H9	1	1.73 (tt, 7.8, 4.5)	15.17(CH)	C9
H10 e H11	4	1.29 – 1.22 (m, 2H) e 1.01 – 0.94 (m)	9.50 (CH_2)	C10 e C11

a: deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

b: multiplicidade

c: constantes de acoplamento em Hz.

Com todos esses dados e informações, foi possível confirmar a obtenção do composto, sendo assim, prosseguimos para as próximas etapas do trabalho, que envolveu os ensaios biológicos contra os parasitas e o planejamento das novas modificações dos compostos.

4.2.2 Resultados dos ensaios biológicos do composto **3**

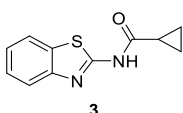
Após a identificação da obtenção do composto desejado, o mesmo foi enviado para realização dos ensaios biológicos, realizados em colaboração pela dra. Silvane Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte. O composto foi testado contra os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum*, causadores da doença de Chagas e da leishmaniose, respectivamente.

A atividade biológica é medida através dos valores de IC_{50} , que representam a concentração necessária para inibir 50% da concentração de parasitas, dessa forma, quanto menor for esse valor, mais potente será o composto. O composto **3** apresentou uma baixa

atividade contra o *T. cruzi*, (com um valor IC_{50} de 112,4 μ M) e uma atividade moderada contra a *L. infantum* (IC_{50} de 19,9 μ M).

A citotoxicidade do composto foi medida também contra a célula hospedeira do parasita *L. infantum* e pode ser representada pelo valor de CC_{50} , apresentando um valor de 2453 μ M, calculando o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/IC_{50}$) tem um valor 123,3. Como o composto apresentou uma potência muito baixa contra o *T. cruzi*, o valor de CC_{50} não foi calculado contra a célula hospedeira do parasita. Na Tabela 3, é possível observar esses resultados para o composto **3**, onde os valores de IC_{50} dos compostos estão sendo comparados com os valores do Benznidazol (contra o *T. cruzi*) e da Anfotericina B (contra a *L. infantum*), utilizados como controle positivo nesses ensaios.

Tabela 3 – Resultados obtidos dos ensaios biológicos.

Composto	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	CC_{50} THP1 (leish)	IS (<i>L. infantum</i>)
Bzn	3.8 μ M	-	-	-
AmB	-	0.25 \pm 0.04 μ M	363.8 μ M	1455
	112,4 μ M	19,9 μ M	2453 μ M	123,3

Como nem o composto **1** e nem o composto **2**, avaliados no trabalho de Fleau e colaboradores, foram sintetizados nesse projeto, não foi possível fazer uma análise direta comparando a potência dos compostos sintetizados por eles com o composto **3**, contra a doença de Chagas. Entretanto, através de uma análise indireta, foi possível observar uma significativa diferença entre os valores de IC_{50} do composto com diferentes grupos substituintes em seu anel aromático e o composto somente com hidrogênios como grupos substituintes, cerca de 180 vezes o valor do composto com o cloro, o que pode indicar que a presença de grupos substituintes diferentes de hidrogênios pode favorecer a potência dos compostos.

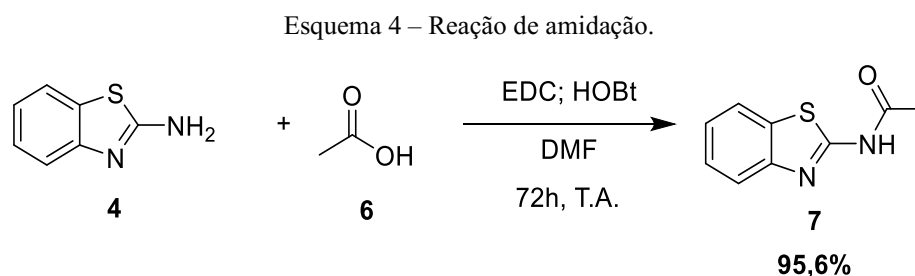
Por outro lado, como o composto **3** apresentou uma atividade interessante contra a *L. infantum* e não possuem dados dessa classe de compostos contra esse parasita, nosso grupo decidiu continuar as investigações dessa classe, realizando modificações estruturais no fragmento ciclopropil e avaliando a atividade biológica desses compostos, tanto contra o *T. cruzi* quanto contra a *L. infantum*.

4.3 Modificações no fragmento ciclopropil

4.3.1 Síntese e caracterização dos compostos **7** e **9**

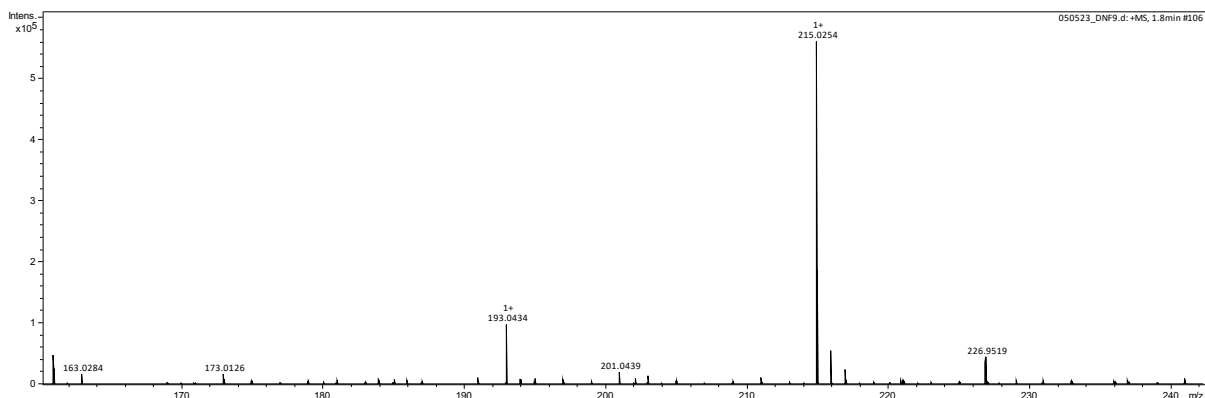
A próxima modificação realizada nesse projeto, foi a substituição do fragmento ciclopropil por uma metila, afim de verificar a influência da troca de um grupo mais lipofílico por um menos lipofílico.

A síntese desse composto se deu através da mesma metodologia para a síntese do composto **3**, uma reação de amidação, reagindo o benzotiazol **4** e o ácido acético **6**, utilizando o EDC como ativador, o HOBt como catalisador e DMF como solvente, a temperatura ambiente (Esquema 4). O mecanismo dessa reação é o mesmo do composto **3** e pode ser observado no Esquema 3.



O produto obtido foi analisado através de HRMS (Figura 14), onde foi possível observar o principal pico do íon molecular em m/z 215,0254, sendo o valor teórico para o composto $[M+Na]^+$ desejado em m/z 215,0250, tendo um erro aproximado de 1,86 ppm. Como os valores teóricos de massa exata do composto é semelhante ao do obtido experimentalmente, com um erro relativamente baixo, é possível concluir que o produto obtido possui a mesma massa e fórmula molecular do composto desejado, o que indica a obtenção do composto esperado.

Figura 14 – Espectro de HRMS do composto 7.



Os dados de infravermelho forneceram as informações sobre os estiramentos das ligações presentes na estrutura do composto sintetizado, sendo possível observar as mesmas ligações observadas para o composto **3**, com uma pequena diferença no deslocamento dos sinais (Figura 15). Os sinais das bandas observadas referentes as ligações foram: da ligação dupla entre carbonos do anel aromático (1601 cm^{-1}), da ligação dupla da carbonila (1690 cm^{-1}), da ligação entre carbono e hidrogênio (multiplete centrado em 2938 cm^{-1}), podendo ser tanto das ligações do anel aromático quanto da metila, e da ligação entre o nitrogênio e hidrogênio da amida (duplete centrado em 3181 cm^{-1}). A relação dos valores observados com os valores teóricos pode ser observada na Tabela 4.

Figura 15 – Espectro de IV do composto 7.

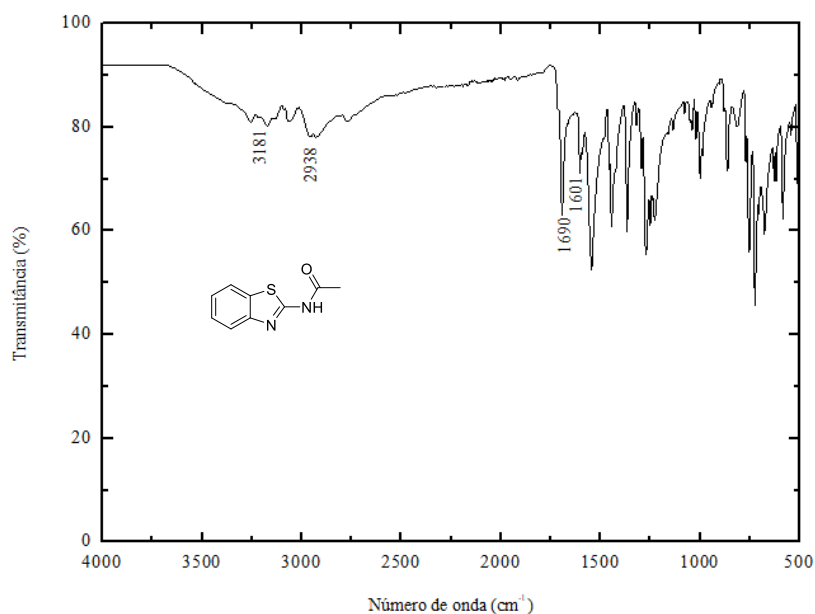


Tabela 4 – Relação dos valores de estiramentos observados com os valores teóricos.

Ligação	Experimental (cm ⁻¹)	Teórico* (cm ⁻¹)
C=C	1601	1600
C=O	1690	1700-1640
C-H	2938	3150-2850
N-H	3181	3500-3100

a: Os valores teóricos dos estiramentos das ligações foram retirados do livro de Pavia, 2015.

Para a confirmação do composto, foi feita a análise de RMN do produto, onde foi possível observar, no RMN ¹H (Figura 16), o singlete largo referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida, o singlete referente aos três hidrogênios da metila, além dos dupletos e tripletos referentes ao anel aromático. Já no RMN ¹³C (Figura 17), foi possível observar os sinais referentes ao carbono da carbonila, aos carbonos do anel aromático, ao carbono da imina e ao carbono da metila, confirmando assim a obtenção do produto desejado. As atribuições aos hidrogênios e carbonos estão reportadas na Tabela 5.

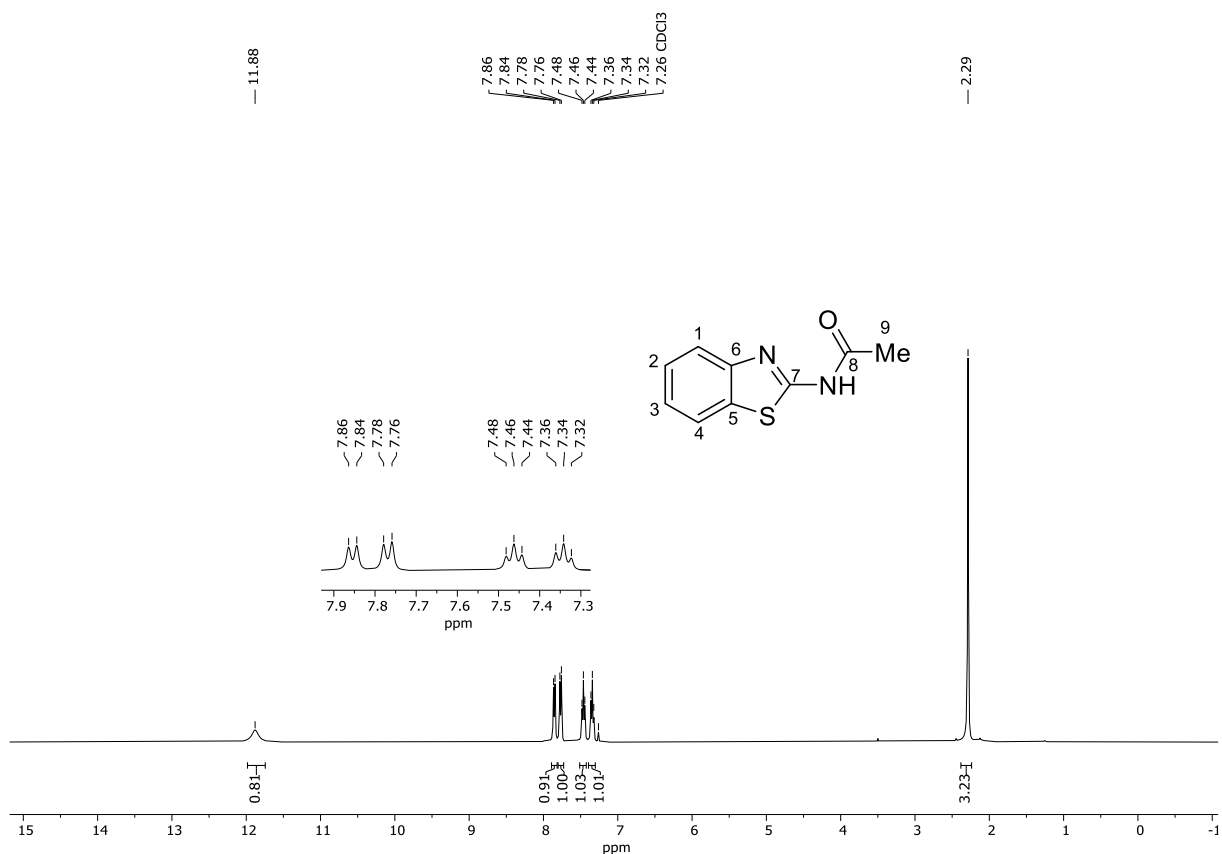
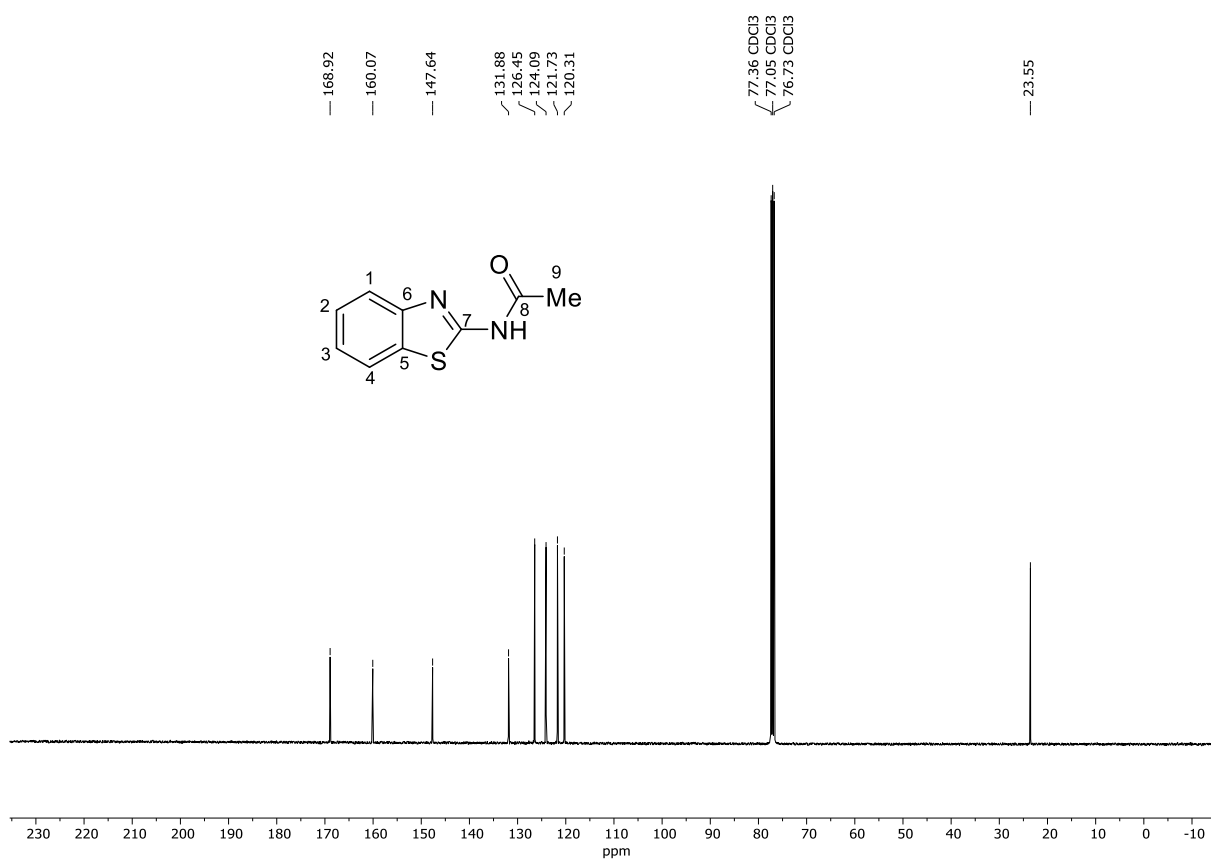
Figura 16 – Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de 7.

Figura 17 – Espectro de RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto 7.Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto 7 (CDCl_3).

Posição H	Nº de H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m ^b J ^c)	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (m ^b)	Posição C
NH	1	11.88 (s)	-	-
-	-	-	168.92 (C)	C8
-	-	-	160.07 (C)	C7
-	-	-	147.64 (C)	C6
-	-	-	131.88 (C)	C5
H2	1	7.46 (t, 7.7)	126.45 (CH)	C2

H3	1	7.34 (t, 7.6)	124.09 (CH)	C3
H4	1	7.77 (d, 8.1)	121.73 (CH)	C4
H1	1	7.85 (d, 7.9)	120.31 (CH)	C1
H9	3	2.29 (s)	23.55 (CH ₃)	C9

a: deslocamentos químicos em ppm

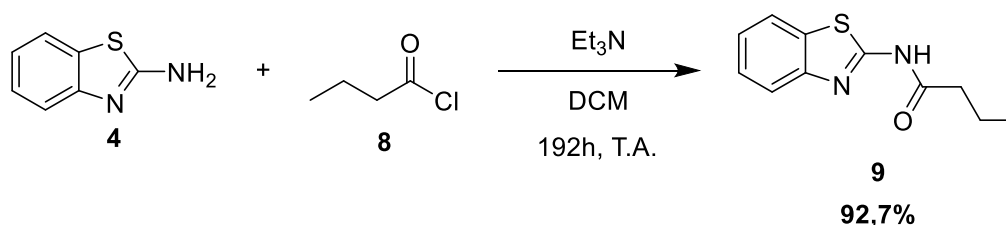
b: multiplicidade

c: constantes de acoplamento em Hz.

A última modificação realizada foi a substituição do fragmento ciclopropil por uma propila, afim de analisar a influência de um grupo com a mesma quantidade de carbonos, porém com uma cadeia acíclica, o que torna a fragmento menos lipofílico e permite uma maior flexibilidade do fragmento, que pode facilitar a interação do composto com o parasita.

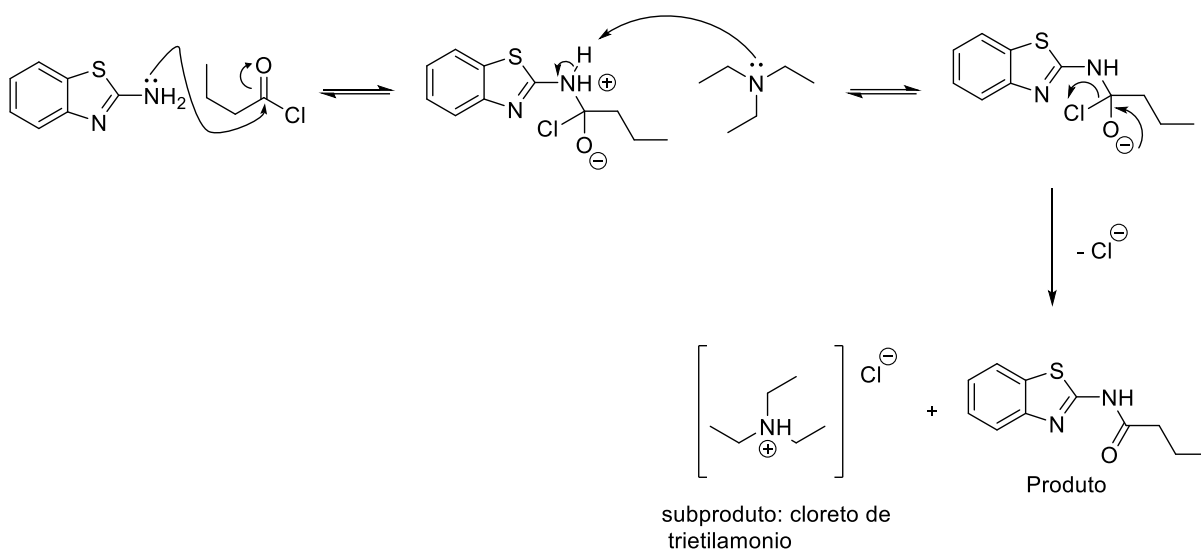
A síntese desse composto se deu através de uma reação de amidação, com uma metodologia diferente dos dois outros compostos, utilizando, para isso, um cloreto de acila e a trietilamina como base, solubilizando a reação em diclorometano (Esquema 5).

Esquema 5 – Reação de amidação com o cloreto.



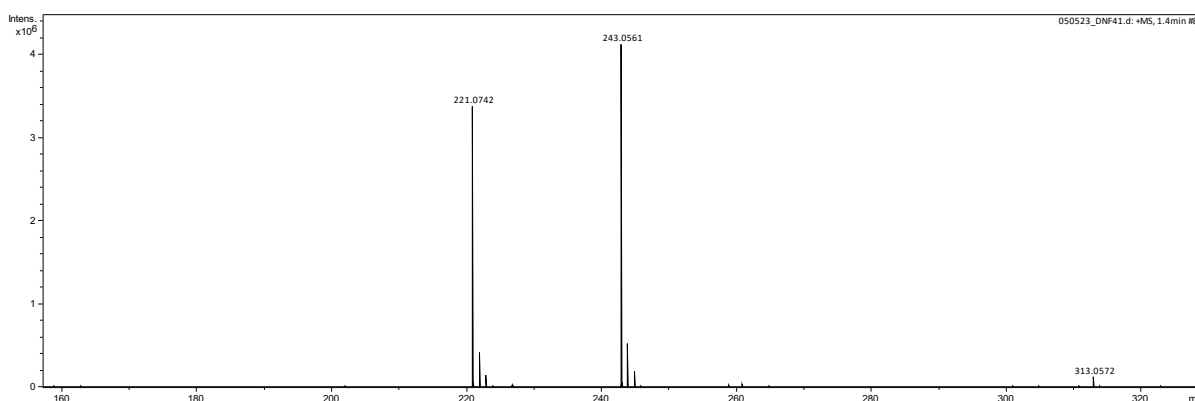
O mecanismo da reação pode ser observado no Esquema 6, iniciando com o par de elétrons do benzotiazol realizando um ataque a carbonila do cloreto, formando um intermediário com o nitrogênio carregado positivamente, que será desprotonado pela base. Por fim, a carga negativa do oxigênio será estabilizada restabelecendo a ligação dupla da carbonila e removendo o cloro, formando a amida como produto e o cloreto de trietilamonio como subproduto.

Esquema 6 – Proposta de mecanismo para a reação de amidação utilizando cloreto de acila.



O produto obtido foi analisado através de HRMS (Figura 18), onde foi possível observar o principal pico do íon molecular em m/z 243,0561, sendo o valor teórico para o composto $[M+Na]^+$ desejado em m/z 243,0563, tendo um erro de 0,83 ppm. Além disso é possível observar um outro pico em m/z 221,0742, referente ao íon molecular do composto $[M+H]^+$, cujo o valor teórico é em m/z 221,0743. Como o valor teórico do composto $[M+Na]^+$ é semelhante ao valor experimental $[M+Na]^+$ (com um erro muito baixo), é possível concluir que o produto obtido possui a mesma massa e fórmula molecular do composto desejado, o que indica a obtenção do composto esperado.

Figura 18 – Espectro de HRMS do composto 9.



Em seguida foi feita a análise do espectro de infravermelho do produto, com o objetivo de identificar os principais grupos funcionais do composto, que indicaria a obtenção do composto desejado (Figura 19). Novamente foi possível observar os mesmos sinais referentes as mesmas ligações observadas para os compostos 5 e 7, com uma pequena diferença nos deslocamentos dos sinais. As bandas observadas, nesse espectro, são os sinais referentes: a ligação dupla entre carbonos do anel aromático (1600 cm^{-1}), da ligação dupla da

carbonila (1698 cm^{-1}), a ligação entre o carbono e o hidrogênio (multiplete centrado em 2925 cm^{-1}), podendo ser tanto das ligações do anel aromático quanto da propila, e a ligação entre o nitrogênio e hidrogênio da amida (duplete centrado em 3238 cm^{-1}). A relação dos valores observados com os valores teóricos pode ser observada na Tabela

Figura 19 – Espectro de IV do composto **9**.

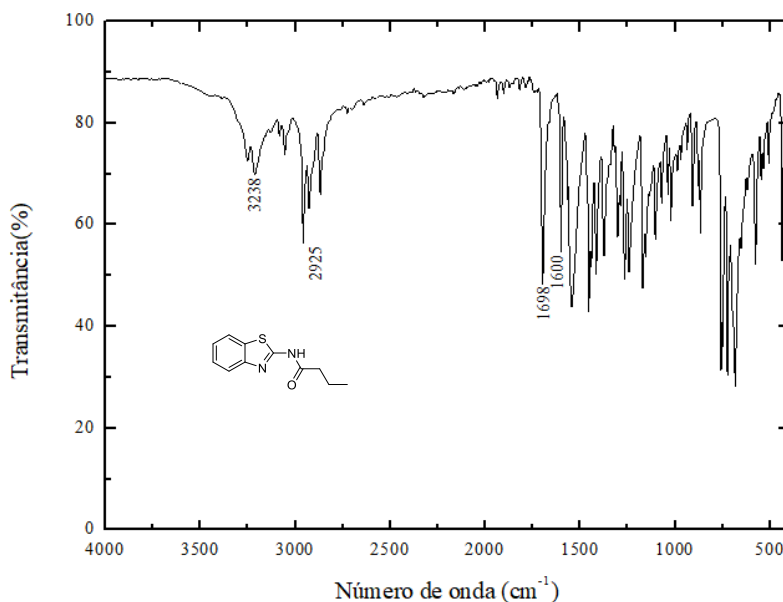


Tabela 6 – Relação dos valores de estiramentos observados com os valores teóricos.

Ligação	Experimental (cm^{-1})	Teórico* (cm^{-1})
C=C	1600	1600
C=O	1698	1700-1640
C-H	2925	3150-2850
N-H	3238	3500-3100

a: Os valores teóricos dos estiramentos das ligações foram retirados do livro de Pavia, 2015.

Por fim, o composto foi confirmado através da análise de RMN do produto, onde foi possível observar, no espectro de RMN ^1H (Figura 20), todos os sinais referentes aos hidrogênios do anel aromático, um singlete largo referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida, além dos três sinais referentes aos hidrogênios da propila (dois sinais para os dois CH_2 e um sinal para o CH_3). No espectro de RMN de ^{13}C APT (Figura 21), observou todos os sinais referentes aos carbonos do anel aromático, o sinal referente ao carbono da carbonila, o sinal referente ao carbono da imina, além dos três sinais referentes aos carbonos da propila. As atribuições aos hidrogênios e carbonos estão reportadas na Tabela 7.

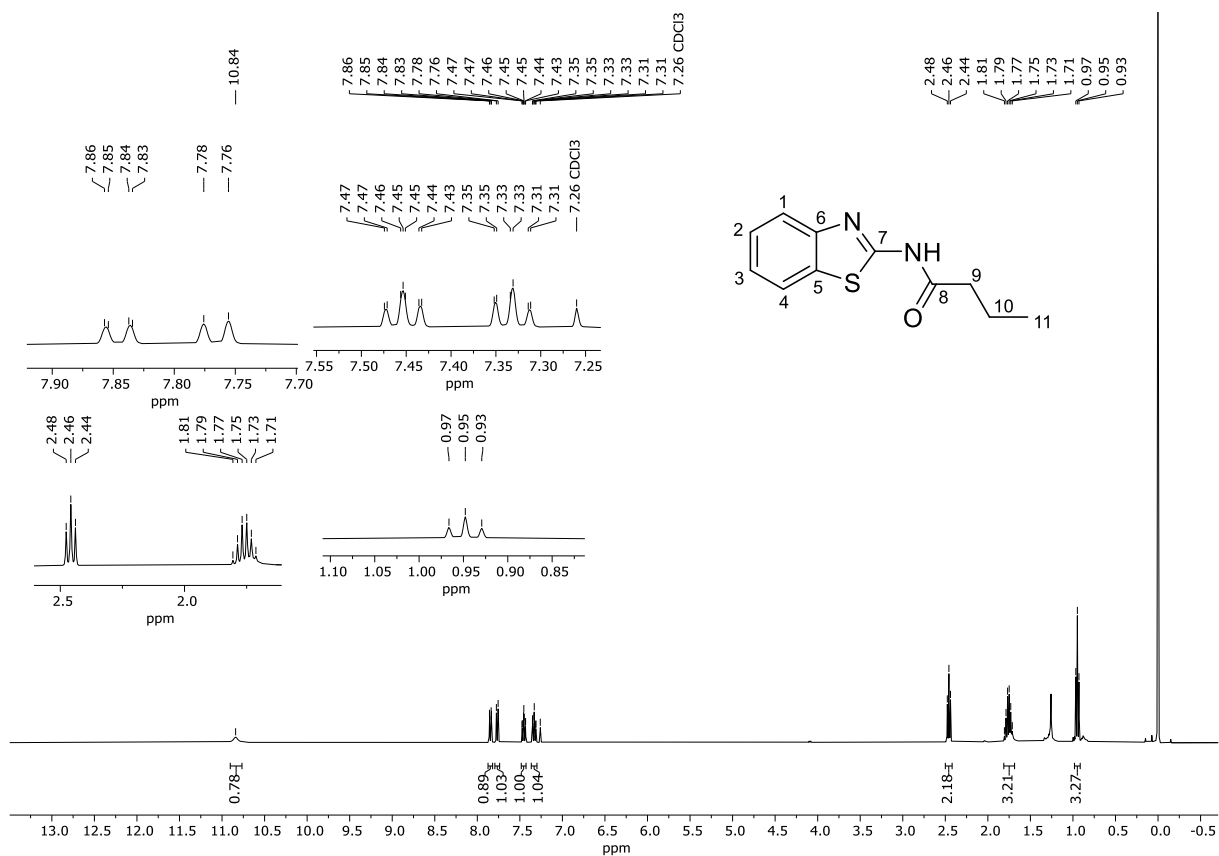
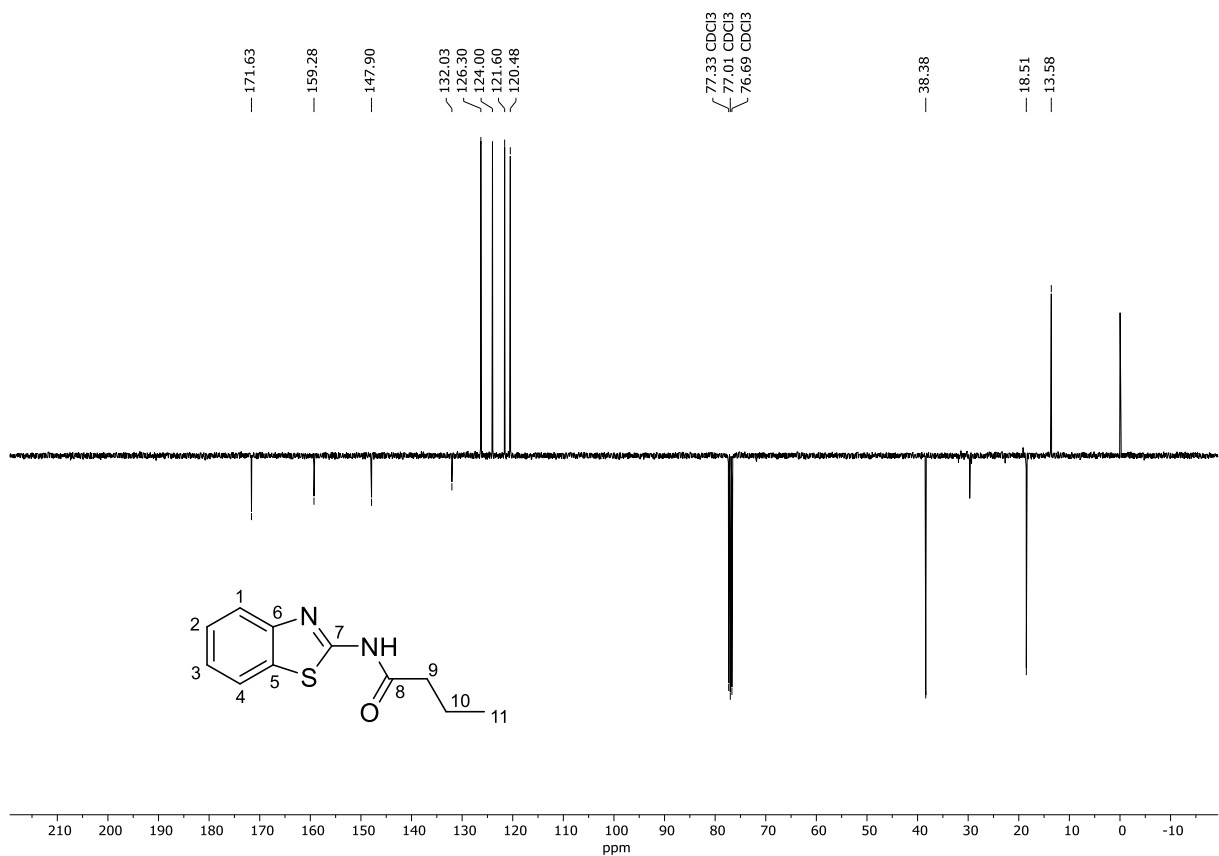
Figura 20 – Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **9**.Figura 21 – Espectro de RMN ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) do composto **9**.

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do composto **9** (CDCl_3).

Posição H	Nº de H	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{b} J^{c})	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (m^{b})	Posição C
NH	1	10.84 (s)	-	-
-	-	-	171.63 (C)	C8
-	-	-	159.28 (C)	C7
-	-	-	147.90 (C)	C6
-	-	-	132.03 (C)	C5
H2	1	7.45 (ddd, 8.3, 7.3, 1.2)	126.30 (CH)	C2
H3	1	7.37 – 7.30 (m)	124.00 (CH)	C3
H4	1	7.77 (d, 8.1)	121.60 (CH)	C4
H1	1	7.85 (dd, 7.9, 1.2)	120.48 (CH)	C1
H9	2	2.46 (t, 7.5)	38.38 (CH_2)	C9
H10	3	1.76 (h, 7.4)	18.51 (CH_2)	C10
H11	3	0.95 (t, 7.4)	13.58 (CH_3)	C11

a: deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

b: multiplicidade

c: constantes de acoplamento em Hz.

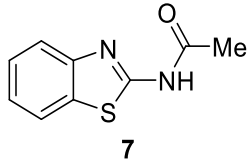
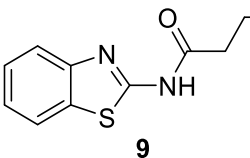
Apesar do composto **9** possuir um hidrogênio a mais na posição H10, que pode ser justificada pela presença de água, foi possível confirmar a obtenção do produto esperado. Dessa forma, os compostos **7** e **9** foram enviados para a realização dos ensaios biológicos.

4.3.2 Resultados ensaios biológicos

Após a obtenção dos dois compostos, foi feito o envio para a realização dos ensaios biológicos, realizados em colaboração pela dra. Silvane Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte.

Os resultados desses ensaios podem ser observados na Tabela 8, onde estão relatados os valores de IC₅₀ contra os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum*, o valor de CC₅₀ contra a célula hospedeira da *L. infantum* e os valores de índice de seletividade contra esse parasita, utilizando o benznidazol (contra o *T. cruzi*) e a anfotericina B (contra a *L. infantum*) como controle positivo.

Tabela 8 – Resultados dos ensaios biológicos contra o *T. cruzi* e a *L. infantum*.

Composto	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	CC ₅₀ THP1 (leish)	IS (<i>L. infantum</i>)
Bzn	3.8 µM	-	-	-
AmB	-	0.25 ± 0.04 µM	363.8 µM	1455
 7	>260,1 µM	153.3 µM	1079 µM	7,04
 9	>100 µM	307.48 µM		

Como o valor de IC₅₀ dos compostos contra o *T. cruzi* foram todos muito alto, especialmente quando considerado os valores encontrados para os compostos no trabalho de Fleau, não foram realizados os testes contra a célula hospedeira do parasita. Da mesma forma, pelo alto valor de IC₅₀ do composto **9** contra a *L. infantum*, não foi feito o ensaio de CC₅₀ para esse composto.

Relacionando os resultados da tabela 4 com os dados dos ensaios biológicos para o composto **3**, é possível analisar as relações entre a estrutura dos compostos e sua atividade contra os parasitas.

Em relação ao *T. cruzi*, a substituição do ciclopropil por uma propila não afetou significativamente a potência contra o parasita, uma vez que os compostos tiveram valores de IC₅₀ relativamente próximos. Entretanto, a substituição por uma metila resultou em uma perda significativa de potência, aumentando em mais de duas vezes o valor de IC₅₀.

Esses resultados demonstram a importância da lipofilicidade para a atividade, evidenciando que compostos com maior lipofilicidade no fragmento ciclopropil parecem possuir uma potência mais alta do que compostos menos lipofílicos. Isso pode ser justificado pelas interações intermoleculares, onde compostos mais lipofílicos podem chegar com maior facilidade ao alvo responsável pela inibição do parasita, além de poderem realizar maiores interações com os fragmentos lipofílicos desse alvo. Por outro lado, a substituição de uma cadeia fechada por uma cadeia aberta não demonstrou grandes alterações em sua potência, o que não entregou muitas informações sobre a importância da rigidez do fragmento para a atividade biológica do composto.

Já para a atividade dos compostos contra a *L. infantum*, as duas substituições diminuíram drasticamente a potência dos compostos, aumentando em cerca de oito vezes o valor de IC₅₀ após a substituição do ciclopropil por uma metila, e em cerca de quinze vezes quando substituí por uma propila.

Essa perda de potência pode ser justificada tanto pela lipofilicidade quanto pela rigidez do fragmento dos compostos. Analogamente ao caso dos compostos contra o *T. cruzi*, a substituição do fragmento por um grupo menos lipofílico diminuiu consideravelmente a atividade do composto contra a *L. infantum*, o que, como discutido anteriormente, pode ser resultado das interações intermoleculares dos compostos.

Observando também os valores de CC₅₀ dos compostos contra a célula hospedeira, é possível perceber que a substituição por um grupo menos lipofílico aumentou também a citotoxicidade do composto, diminuindo assim a sua seletividade. Isso indica que a inibição do parasita pelo composto pode ser resultado de uma citotoxicidade que afeta a célula como um todo e não de uma atividade biológica do composto contra o parasita em si.

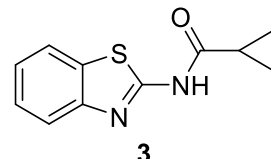
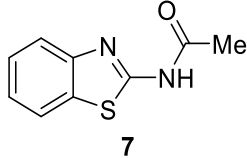
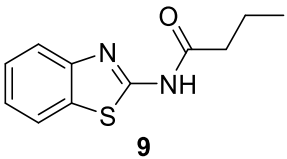
A substituição de uma cadeia fechada por uma cadeia aberta permitiria uma maior flexibilidade do fragmento, que por sua vez, poderia rotacionar, flexionar ou distorcer afim de encontrar uma melhor posição do fragmento para interagir com o sitio responsável pela inibição do parasita. Entretanto, a drástica perda de atividade biológica indica uma preferência

por um fragmento com maior rigidez, o que pode ocorrer devido a necessidade de fragmentos mais rígidos para se encaixarem com mais facilidade em algum sítio específico essencial para a inibição do parasita.

4.4 Resultados *in silico* para os compostos sintetizados

Alguns dados teóricos, referentes a lipofilicidade e a biodisponibilidade dos compostos, foram coletados também, utilizando algumas ferramentas online, afim de verificar a probabilidade desses compostos funcionarem como fármacos oralmente ativos. Com esses dados de número de átomos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio, massa molecular e de coeficiente de partição, foi possível avaliar pela Regra de Lipinski a biodisponibilidade do composto (ARNOTT, 2012). Esses dados podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9 – Dados teóricos dos compostos.

Composto	Massa molecular	C log P	Nº de aceptores de ligação de H	Nº de doadores de ligação de H	Violação da Regra de Lipinski
 3	218,27	2,23	2	1	0
 7	192,24	1,72	2	1	0
 9	220,29	2,46	2	1	0

Dados teóricos obtidos através de predições online pelo site: <http://www.swissadme.ch>.

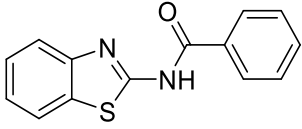
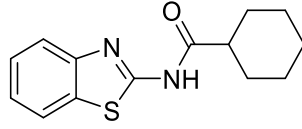
Como dito anteriormente, a regra de Lipinski estabelece que os fármacos oralmente ativos, em geral, não podem possuir não mais do que duas violações desses quatro critérios: ter no máximo cinco átomos doadores de ligação de hidrogênio, dez átomos aceptores de ligação de hidrogênio, massa molecular até no máximo 500 Daltons (Da) e um

coeficiente de partição calculado (C log P) menor que 5 (ARNOTT, 2012). Como pode ser observado pela tabela, todos os três compostos sintetizados e testados se encaixam dentro dos parâmetros estabelecidos por Lipinski, o que indica que esses compostos possuem uma boa biodisponibilidade e uma probabilidade de agirem como fármacos oralmente ativos.

4.5 Outras modificações

Mais dois compostos foram sintetizados por outros membros do nosso grupo de pesquisa, sendo testados também contra esses dois parasitas. As modificações realizadas nesses compostos foram a troca do fragmento ciclopropil pelo fenil e pelo cicloexil, afim de verificar a influência da lipofilicidade e da rigidez no fragmento ciclopropil, sendo possível observar esses resultados na Tabela 10. O cicloexano é altamente lipofílico e rígido, devido a maior quantidade de carbono e uma cadeia fechada, que limita a quantidade de rotações e distorções que esse grupo pode fazer, entretanto, o benzeno é mais lipofílico e possui uma rigidez ainda maior devido a presença das ligações duplas em seu anel aromático.

Tabela 10 – Resultados biológicos de compostos sintetizados por colaboradores do grupo.

Estrutura	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	CC ₅₀ THP1 (<i>L. infantum</i>)	IS (<i>L. infantum</i>)
Bzn	3.8 µM	-	-	-
AmB	-	0.25 ± 0.04 µM	363.8 µM	1455
 10	96.3 µM	12,7 µM	> 3932 µM	309,6
 11	71,4 ± 2,3 µM	5,5 µM	203 µM	36,9

Os resultados para esses compostos foi a diminuição moderada do valor de IC₅₀, quando comparado com composto **5**, contra o *T. cruzi*, o que significa que esses dois

compostos possuem uma potência relativamente maior do que com o fragmento com o ciclopropil, porém essa potência ainda assim é bem abaixo do que a relatada no artigo de Fleau.

Já contra *L. infantum*, a troca do fragmento ciclopropil pelo cicloexil, demonstrou uma significativa melhora na potência do composto, porém resultou também no aumento da citotoxicidade do mesmo, indicando uma menor seletividade contra o parasita, porém um IS adequado para a realização de ensaios *in vivo*. A troca pelo fenil, por sua vez, demonstrou uma pequena melhora de potência e uma considerável diminuição de citotoxicidade, resultando em uma maior seletividade do composto. Ambos os compostos apresentaram atividade biológica relevante contra o *L. infantum*, destacando a importância de estudos mais aprofundados dessa classe química contra a leishmaniose visceral.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi feita a síntese e caracterização de um composto acilaminobenzotiazol, tendo como base o trabalho de Fleau e colaboradores (2019), no qual foram reportadas uma série dessa classe de compostos como potenciais fármacos contra o *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. No nosso trabalho, foi realizada uma modificação no fragmento benzotiazol, onde foi feita a substituição dos grupos substituintes do anel por um fragmento somente com hidrogênios como substituinte. O composto foi sintetizado através de uma única reação com reagentes disponíveis comercialmente e a caracterização do composto foi feita utilizando as técnicas de HRMS, IV e RMN de hidrogênio e de carbono.

Após a síntese e caracterização do composto, o mesmo foi enviado para ensaios biológicos contra o *T. cruzi*, realizados em colaboração pela dra. Silvane Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte. Foram realizados também ensaios biológicos contra o parasita *L. infantum*, principal causador da leishmaniose, tendo em vista algumas semelhanças entre os dois parasitas, que poderia indicar que talvez o composto tivesse atividade biológica contra os dois parasitas.

Os resultados biológicos foram expressos através do seu IC₅₀, que representam o potencial farmacológico do composto contra o parasita. O composto demonstrou possuir uma potência muito abaixo do esperado contra o *T. cruzi*, especialmente quando comparado com os dos compostos reportados por Fleau. Entretanto, o composto demonstrou uma potência moderada contra *L. infantum*, tendo um IC₅₀ de 19,9 µM, além de uma baixa citotoxicidade, representada pelo valor de CC₅₀ de 2453 µM, contra a célula hospedeira do parasita, tendo uma seletividade de 123,3.

A potência moderada do composto contra a *L. infantum* e a falta de exploração dessa classe de compostos contra esse parasita na literatura, nos motivou a continuar explorando essa classe de compostos contra esses parasitas. Dessa forma, nosso objetivo foi realizar modificações no fragmento ciclopropil e avaliar o efeito dessas modificações na atividade biológica dessa classe de compostos contra o *T. cruzi* e a *L. infantum*.

Mais dois compostos foram então sintetizados e caracterizados, utilizando as mesmas técnicas do composto **3**, sendo novamente enviados para os testes biológicos contra o *T. cruzi* e a *L. infantum*, realizados pela dra. Silvane Maria Fonseca Murta. As modificações realizadas nesses compostos foram a substituição do ciclopropil por uma metila e por uma

propila, afim de verificar a influência da lipofilicidade e da rigidez do fragmento na atividade biológica dessa classe de compostos.

Contra o *T. cruzi*, a troca do ciclopropil pela propila resultou em uma potência semelhante entre esses dois compostos, enquanto a troca pela metila resultou na diminuição da potência do composto em cerca de duas vezes menos do que com o composto com o ciclopropil. Como todos os compostos tiveram uma baixa atividade contra o *T. cruzi*, os testes de citotoxicidade desse composto contra o parasita não foram realizados, de forma que a seletividade não pode ser determinada. Esses resultados demonstram a importância de um fragmento mais lipofílico para a atividade contra o parasita, porém não fornece muita informação sobre a importância da rigidez do fragmento.

Contra a *L. infantum*, por sua vez, as duas modificações resultaram em uma perda significativa de atividade, sendo que, a troca pela propila muito mais significativa, de forma que sua citotoxicidade não foi determinada. A troca pela metila, além da diminuição da potência, resultou também em um aumento da citotoxicidade, de forma que o composto se tornou menos seletivo contra o parasita. Isso indica, para a atividade contra a *L. infantum*, a necessidade de um fragmento mais lipofílico e com maior rigidez para a potência dessa classe de compostos.

Outros dois compostos foram sintetizados, por outros membros do nosso grupo de pesquisa, e foram testados contra os parasitas, sendo possível perceber a importância da lipofilicidade e da rigidez do fragmento para a atividade biológica, uma vez que esses compostos possuem uma cadeia carbônica maior, cíclica e um anel aromático, em um desses compostos.

Com tudo isso, dentre os compostos avaliados, os que demonstraram uma melhor atividade contra a *L. infantum* foram os compostos **3**, **10** e **11**. Porém, em relação ao *T. cruzi*, todos os três compostos tiveram uma baixa atividade, de forma que sua citotoxicidade contra a célula hospedeira não foi testada e a sua seletividade não foi determinada.

Para os próximos passos, é necessário avaliar mais compostos com modificações estruturais em outros fragmentos da molécula, com o objetivo de melhorar a atividade biológica desses compostos contra os parasitas. Algumas dessas modificações já estão sendo feitas atualmente por outros membros do grupo, que estão realizando algumas modificações no fragmento benzotiazol, mantendo fixo os grupos modificados no fragmento ciclopropil que melhor tiveram atividade. O estudo da relação entre a estrutura e atividade irá fornecer informações sobre os melhores grupos em cada fragmento da molécula, de forma a facilitar no planejamento de novas modificações que possam ser realizadas na estrutura dessa classe de

compostos, para encontrar o composto com melhor potência contra os parasitas e que possua a menor toxicidade.

Outros estudos também são necessários para compreender melhor o funcionamento do mecanismo de ação desses candidatos a fármacos, como por exemplo, os estudos de Adsorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME), de lipofilicidade e farmacocinéticos, além da identificação do alvo específico onde aquele candidato a fármaco atua. A identificação do alvo permitiria identificar um componente em comum entre a estrutura do *T. Cruzi* e da *L. infantum*, assim contribuindo para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos que possam funcionar contra os dois parasitas.

O aumento no número de casos, o alto índice de morte, o espalhamento dessas doenças para outras regiões não endêmicas, além da ineficácia e sequelas dos tratamentos disponíveis e o longo tempo de duração desses tratamentos, tudo isso são fatores evidenciam a necessidade de novos tratamentos contra esses parasitas. Dessa forma, esse trabalho se torna relevante por contribuir no estudo e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos contra a doença de Chagas e a leishmaniose, fornecendo informações que contribuem para a compreensão da relação entre a estrutura e atividade de compostos acilaminobenzotiazóis.

6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.1 Reagentes e Solventes

Os reagentes e solventes disponíveis comercialmente foram utilizados sem purificação prévia. Não foi utilizado nenhum solvente anidro nesse projeto. Acetato de Etila (AcOEt) e hexano (Hex) foram destilados antes do uso, enquanto os demais solventes foram utilizados sem tratamento prévio.

6.2 Métodos Cromatográficos

Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada utilizando placas obtidas a partir de cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica-gel 60 F254 (Sigma Aldrich). A visualização se deu através de luz ultravioleta (254 nm) e atmosfera de iodo.

6.3 Métodos Analíticos

6.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono 13 (RMN de ^{13}C) foram obtidos no aparelho Bruker Ascend 400 (400 MHz para RMN de ^1H e 101 MHz para RMN de ^{13}C) do Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da UFU. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna, resíduos de solvente não deuterado: clorofórmio (7,25 ppm para RMN de ^1H ; 77,0 ppm para RMN de ^{13}C). Os valores das constantes de acoplamento foram medidos diretamente nos espectros de RMN de ^1H utilizando o programa MestReNova.

6.3.2 Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em parceria com o Prof. Eduardo Jorge Pilau, coordenador do Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (LABIOMASS) na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em um espectrômetro de massas de alta resolução Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) de geometria Q-TOF, equipado com uma fonte de ionização do tipo electrospray, operado em modo positivo 1 Hz (MS) na faixa de massas de m/z 50 – 1000. As análises foram realizadas com voltagem do capilar de 3.0 kV; temperatura da fonte 180°C; e fluxo do gás de dessolvatação 4

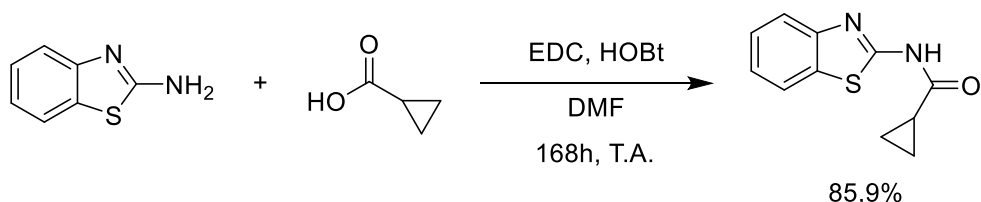
L min⁻¹. Os experimentos de MS/MS foram realizados utilizando dissociação induzida por colisão (CID) com uma rampa de energia de colisão na faixa de 15 – 40 eV.

6.3.3 Infravermelho

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos através do espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR da Perkin Elmer, na região compreendida entre 4000-220 cm⁻¹. As amostras foram analisadas no estado sólido, com auxílio do acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante. Equipamento este pertencente ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) localizado no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

6.4 Procedimento Experimental (Síntese)

6.4.1 Síntese do composto 3



Em um balão, adicionou o ácido (256,4 mg, 2,97 mmol), o benzotiazol (200,0 mg, 1,33 mmol), o EDC (637,4 mg, 3,32 mmol), HOBT (18 mg, 0,133 mmol), solubilizando em DMF (4 mL). A reação ficou em agitação magnética sob temperatura ambiente durante 4 dias, após esse tempo verificou que a reação não tinha finalizado, então foi colocada em aquecimento a 80 °C. A reação foi finalizada adicionando água e o precipitado formado foi recuperado com metanol e diclorometano, concentrado e secado, levando a obtenção do **5**.

(3) sólido branco, 249,5 mg, 85,9%. Massa Exata calculada [M + Na]⁺ calculado: m/z 241.0406. Encontrado: m/z 241.0406. Erro: 0 ppm. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 12.06 (s, 1H), 7.84 (ddd, J = 7.9, 1.2, 0.6 Hz, 1H), 7.78 (ddd, J = 8.1, 1.1, 0.6 Hz, 1H), 7.44 (td, J = 8.3, 7.3, 1.3 Hz, 1H), 7.35 – 7.29 (m, 1H), 1.73 (m, J = 7.8, 4.5 Hz, 1H), 1.26 (m, J = 4.4, 3.0 Hz, 2H), 0.98 (m, J = 7.8, 3.2 Hz, 2H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)** δ 172.77, 160.03, 147.82, 131.97, 126.30, 123.89, 121.66, 120.21, 15.17, 9.50.

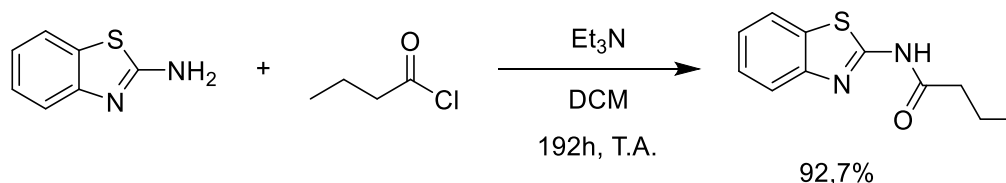
6.4.2 Síntese do composto 7



Em uma solução do benzotiazol (300,0 mg, 1,997 mmol), em DMF (3 mL), foi adicionado o EDC (957,1 mg, 4,992 mmol), HOBT (27 mg, 0,1997 mmol) e ácido acético (785,6 mg, 12,98 mmol, 0,75 mL). A reação foi agitada sob temperatura ambiente e acompanhada por CCD, durante, aproximadamente 3 dias. A reação foi finalizada adicionando água e o sólido precipitado foi recuperado com metanol, concentrado e secado, levando a obtenção do composto 7.

(7) sólido laranja, 366,9 mg, 95,6%. Massa Exata calculada $[M + Na]^+$ calculado: m/z 215.0250. Encontrado: m/z 215.0254. Erro: 1.86 ppm. **RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 11.88 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.34 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$)** δ 168.92, 160.07, 147.64, 131.88, 126.45, 124.09, 121.73, 120.31, 23.55.

6.4.3 Síntese do composto 9



Em uma solução do cloreto butirila (155,6 mg, 1,46 mmol), em DCM, foi adicionada a trietilamina (269,2 mg, 2,66 mmol) e o benzotiazol (200,0 mg, 1,33 mmol). A reação ficou em agitação durante 192 horas, a temperatura ambiente, sendo acompanhada por CCD (9:1 DCM/MeOH). A reação foi finalizada e feita duas extrações, primeiro com água e com uma solução de hidróxido de sódio. No final, foram obtidas duas fases orgânicas, elas foram concentradas e secadas, obtendo dois sólidos. O sólido mais impuro foi purificado através de coluna cromatográfica 6:4 hexano/acetato de etila. Os sólidos obtidos foram juntados, concentrados e secados, levando a obtenção do produto.

(9) sólido laranja, 272,0 mg, 92,7%. Massa Exata calculada $[M + Na]^+$ calculado: m/z 243.0563. Encontrado: m/z 243.0561. Erro: 0.82 ppm. **RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$)** δ 10.84 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.77 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.45 (ddd, J = 8.3, 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.37 – 7.30 (m, 1H), 2.46 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.76 (h, J = 7.4 Hz, 3H), 0.95 (t, J =

7.4 Hz, 3H). RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) δ 171.63, 159.28, 147.90, 132.03, 126.30, 124.00, 121.60, 120.48, 38.38, 18.51, 13.58.

6.5 Procedimento dos ensaios biológicos contra o *T. cruzi*

6.5.1 Ensaio *in vitro* da β -galactosidase

6.5.1.1 Manutenção de células para plaqueamento

Os experimentos foram realizados conforme protocolo descrito por Buckner (1996) modificado. Culturas de células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo, em meio RPMI 1640 com vermelho de fenol e suplementado com SBF 10% e glutamina 2 mM, foram semeadas em garrafas de 25 cm², 150.000 células, ou garrafas de 75 cm², 450.000 células.

As culturas foram incubadas em estufa 37 °C 5% CO₂. Culturas em garrafas de 25 cm² ou 75 cm² foram infectadas após um período de aproximadamente 24 horas com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa Tulahuen transformada para expressar o gene da β -galactosidase, 20 parasitas por célula. Os parasitas que não penetraram foram retirados por lavagem após 24h, e a cultura foi incubada em estufa 37 °C 5% CO₂.

6.5.1.2 Plaqueamento das células, infecção e tratamento

Para o teste de atividade anti *T. cruzi*, uma placa de 96 poços foi semeada com 4.000 células NTCT clone 929 (L929) (ATCC CCL 1) de tecido conectivo de camundongo em 80 μl por poço de RPMI com vermelho fenol e suplementado. A placa foi incubada “overnight” em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram infectadas com 40.000 tripomastigotas por poço, diluídos em 20 μl de RPMI com vermelho fenol suplementado. A placa foi incubada por 2 horas a 37°C 5% CO₂ e os parasitas que não penetraram foram retirados por substituição com 200 μl por poço de RPMI sem vermelho de fenol e suplementado.

A placa foi novamente incubada a 37 °C e 5% CO₂ por 48 horas para o estabelecimento da infecção. Após 48 horas, o meio de cultura foi trocado por 180 de RPMI sem vermelho de fenol suplementado e 20 μl do composto a ser testado. Compostos pré-

diluídos em DMSO tiveram uma concentração máxima de 10% de DMSO na solução-estoque.

A adição dos compostos à placa foi realizada da seguinte forma: 180 µl de RPMI suplementado e sem vermelho de fenol foram adicionados a cada poço; a seguir, 20 µl dos compostos solubilizados em água ou meio foram adicionados e foi realizada a homogeneização com a pipeta (determinação IC₅₀) ou agitador de placas (triagem). Desta forma, a concentração final dos compostos pós-diluição no meio foi de 1 a 80 µg/ml.

A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 96 horas. Após esse período, foram adicionados 50 µl por poço do substrato CPRG 500 µM com nonidet p40 0,5% e a leitura da placa foi realizada 16 a 20 horas após a adição do substrato, em leitor de ELISA com filtro de 570 nm.

Adicionalmente, foram utilizados os seguintes controles em cada placa: culturas de células não infectadas por parasitas e sem adição de compostos, culturas de células infectadas pelo parasita sem adição de compostos, culturas de células infectadas pelo parasita e tratadas com Benznidazol a 1 µg/ml, culturas de células infectadas pelo parasita tratadas com DMSO 1%. A análise foi realizada considerando a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida, promovida pelo composto testado, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasita na ausência de compostos.

6.6 Procedimento dos ensaios biológicos contra a *L. infantum*

6.6.1 Avaliação da suscetibilidade *in vitro*

Monócitos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 (5x10⁴) foram diferenciados em macrófagos pela adição de 20ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA) em cultura. Após 72 horas da diferenciação de macrófagos THP-1, em placas pretas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY), eles foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) transfectada com o gene *tdTomato*, em fase estacionária (20 parasitos por macrófago) por 4 horas. Após três lavagens com PBS 1X, as células infectadas foram tratadas com várias concentrações dos compostos testados. Foram realizados dois experimentos independentes, em quadruplicata de cada amostra. o IC₅₀ foi determinado pelo método não linear modelo de inclinação variável de regressão de acordo com a equação “log (inhibitor) vs. response” no GraphPad Prisma

v.8.2.0. A concentração do fármaco que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC_{50}) foi determinada pela diminuição da fluorescência dos parasitos na ausência e presença do fármaco, após 72 horas de exposição, por meio de um leitor de microplacas (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com valores de excitação e emissão: 554 e 581 nm, respectivamente.

6.6.2 Avaliação da citotoxicidade

Macrófagos THP-1 ($5,0 \times 10^4$) foram diferenciados em placas de 96 poços e incubadas por 72 horas em meio RPMI 1640 suplementado à 37°C em estufa contendo 5% de CO_2 . Após o período de diferenciação das células, o meio de cultura foi removido, e adicionado meio RPMI 1640 suplementado. Posteriormente, os macrófagos foram tratados com os fármacos, empregando-se diluições seriadas, durante 72 horas à 37°C, em estufa contendo 5% de CO_2 . Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue (Invitrogen™). Foram adicionados aos poços 20µL de uma solução de Alamar Blue em uma diluição de 1:1 e após quatro horas de incubação a leitura foi realizada através dos seguintes comprimentos de onda: 570 e 600nm. Os resultados foram expressos como o percentual diferença na redução entre células tratadas e não tratadas. A concentração do composto que inibe 50% da viabilidade da célula THP-1 (CC_{50}) foi obtida por análise de regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 8.0, Inc. Foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata de cada amostra.

7 REFERÊNCIAS

ARNOTT, J. A.; PLANNEY, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 863-875, 2012. DOI: 10.1517/17460441.2012.714363.

AVELAR, J. B. **Caracterização molecular de isolados de Trypanosoma cruzi obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia, 2008. Orientadora: Ana Maria de Castro. Colaboradora: Eliane Lages Silva.

BOECHAT, V. C. **Ocorrência de Leishmania infantum e alterações histológicas associadas no trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2015.

BRACK, K. et al. Nonpeptidic Tetrafluorophenoxymethyl Ketone Cruzain Inhibitors as Promising New Leads for Chagas Disease Chemotherapy. **Journal of Med. Chem.**, v. 53, n. 5, p. 1763-1773, 2010. DOI: 10.1021/jm901633v.

BRINDHA, J.; BALAMURALI, M. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Front. Chem.**, v. 9, 12 Mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622286>. Acesso em: 28 mar. 2023.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139–146, 2007.

DNDi. Doença de Chagas. Disponível em: <https://dndial.org/doencas/doenca-de-chagas>. Acesso em: 27 mar. 2023.

DNDi. Leishmaniose Cutânea. Disponível em: <https://dndial.org/doencas/leishmaniose-cutanea>. Acesso em: 27 mar. 2023.

DNDi. Leishmaniose Visceral. Disponível em: <https://dndial.org/doencas/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 27 mar. 2023.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179-200, 2010. DOI: 10.1093/bmb/ldp046.

FLEAU, C. et al. Chagas Disease Drug Discovery: Multiparametric Lead Optimization against Trypanosoma cruzi in Acylaminobenzothiazole Series. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 10362-10375, 2019. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01429.

INFOESCOLA. Mosquito-palha. Disponível em: <https://www.infoescola.com/insetos/mosquito-palha>. Acesso em: 28 mar. 2023.

LAL, J. et al. Design and synthesis of novel halogen rich salicylanilides as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 246, p. 114996, 15 jan. 2023. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114996.

LIDANI, K. C. F. et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, p. 166, 2019. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00166. Acesso em: 27 mar. 2023.

MARTINHO, A. C. C. **Planejamento, síntese e estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de uma classe de sulfonilpiperazinas potente contra o Trypanosoma cruzi**. 2021. 129 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química, Uberlândia, 2021. Orientador: Celso de Oliveira Rezende Júnior. Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.456>. Acesso em: 28 mar. 2023.

MEDEIROS, R. A. **Caracterização da Leishmania infantum e Leishmania (Viannia) braziliensis em cães provenientes da Região Metropolitana do Recife, Estado de Pernambuco**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada a Saúde) – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MCNAMARA, N. et al. Hit-to-lead optimization of novel phenyl imidazole carboxamides that are active against Leishmania donovani. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 240, p. 114577, 2022. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114577.

MSD Manuals. Ciclo de vida do Trypanosoma. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/profissional/multimedia/image/ciclo-de-vida-do-trypanosoma->. Acesso em: 28 mar. 2023.

OMS. Neglected Tropical Diseases. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 28 mar. 2023.

PAHO. Chagas Disease. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em: 28 mar. 2023.

PAHO. Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 28 mar. 2023.

PAVIA, D. L. et al. Introduction to Spectroscopy. 5th ed. Cengage Learning, 2014.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Guia dos triatomíneos do Estado de São Paulo. São Paulo, 2018. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-de-chagas/guia_dos_triatomineos_do_estado_de_sao_paulo_final.pdf. Acesso em: 28 mar. 2023.

Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Nota técnica nº 01/2018. Liberação de benznidazol pelo Ministério da Saúde para o tratamento da doença de Chagas. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/Nota_tecnica_liberacao_benznidazol_Chagas_RevKKSC_KMOB.pdf. Acesso em: 28 mar. 2023.

Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Doença de Chagas. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Doenca-de-Chagas#:~:text=Agente%20Etiol%C3%B3gico,fezes%20e%20urina%20do%20inseto>. Acesso em: 28 mar. 2023.

Secretaria de Estado de Saúde de Goiás. Doenças de Chagas. Disponível em: <https://www.saude.go.gov.br/biblioteca/7585-doencas-de-chagas#:~:text=Tratamento%3A%20O%20tratamento%20deve%20ser,tem%20dura%C3%A7%C3%A3o%20de%2060%20dias>. Acesso em: 28 mar. 2023.

SOUSA, R. L. T.; NUNES, M. I.; FREIRE, S. M. **Perfil epidemiológico de pacientes com leishmaniose visceral notificados em hospital de referência em Teresina – PI.** RIES, v. 8, n. 1, p. 126-135, 2019. doi: 10.33362/ries.v8i1.1475.

Vigilância Sanitária da Cidade do Rio de Janeiro. O que são zoonoses? Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/web/vigilanciasanitaria/o-que-sao-zoonoses>. Acesso em: 27 mar. 2023.